

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Geidi Mitt

***FLO11* ekspressioon *Saccharomyces cerevisiae* libisevalt kasvavates  
rakkudes**

Magistritöö

Juhendaja PhD Tiina Tamm

TARTU 2015

## Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Pagaripärmi mitmerakuline kasv .....	6
1.1.1 Filamentne kasv .....	7
1.1.2 Biokile.....	8
1.1.2.1 Adhesioon plastikule .....	9
1.1.2.2 Libisev kasv.....	9
1.1.3 Ülegenoomsed uuringud ja mitmerakuline kasv .....	11
1.2 <i>FLO11</i> ja selle poolt kodeeritav rakupinna adhesiin .....	12
1.2.1 <i>FLO11</i> promootori regulatsioon .....	13
1.2.1.1 Transkriptsiooniline regulatsioon.....	14
1.2.1.2 Epigeneetiline regulatsioon.....	15
1.3 Pagaripärmi mitokondriaalne DNA .....	16
1.3.1 <i>Rho</i> -mutandid.....	17
1.3.1.1 <i>Rho</i> -mutantide filamentne kasv .....	17
1.3.1.2 <i>Rho</i> -mutantide biokile teke .....	18
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	19
2.1 Töö eesmärgid .....	19
2.2 Materjal ja metoodika.....	19
2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid ja tüved .....	19
2.2.2 Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused .....	20
2.2.3 Deletsioonitüvede konstrueerimine .....	20
2.2.4 Erineva <i>FLO11</i> ekspressioonitasemega tüvede konstrueerimine.....	21
2.2.5 Libiseva kasvu analüüs.....	21
2.2.6 Invasiivse kasvu analüüs .....	22
2.2.7 Totaalse RNA eraldamine ja cDNA süntees .....	22

2.2.8 qRT-PCR .....	23
2.3 Tulemused .....	25
2.3.1 <i>FLO11</i> ekspressioonitase <i>rho</i> -mutantides <i>FLO11</i> promootori asendamisel erinevate <i>TEF1</i> promootori variantidega .....	25
2.3.2 Erineva <i>FLO11</i> ekspressioonitaseme mõju <i>rho</i> -mutantide invasiivsele kasvule .....	26
2.3.3 Erineva <i>FLO11</i> ekspressioonitaseme mõju <i>rho</i> -mutantide rakkude matjate struktuuride moodustumisele .....	28
2.3.4 <i>FLO11</i> ekspressioon erinevate <i>TEF1</i> promootori variantidega <i>rho</i> -mutantide matjate kolooniate rakkudes.....	29
2.3.5 Geneetilised interaktsioonid hüpermatjate kolooniate teket põhjustavate deletsioonimutantide ja <i>rho</i> -mutantide vahel.....	31
2.3.6 Hüpermattide teket põhjustavate geenide deleteerimise mõju <i>FLO11</i> ekspressioonile.....	38
2.4 Arutelu .....	40
Kokkuvõte .....	45
Summary .....	47
Kasutatud kirjandus.....	49
Kasutatud veebiaadressid .....	55
Lisad.....	56
Lihtlitsents.....	74

## Kasutatud lühendid

cAMP-PKA – tsükilise adenosinmonofosfaadi-proteiinkinaas A rada (ingl k *cyclic adenosine monophosphate protein kinase A pathway*)

EDTA - etüleendiamiintetraatsetaat

FG MAPK – filamenteerumisspetsiifilise mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi rada (ingl k *filamentous growth mitogen-activated protein kinase pathway*)

G418 – genetitsiin

GPI-ankur – glükosüülfosfatidüülinositol-ankur (ingl k *glycosylphosphatidylinositol anchor*)

kb – kiloaluspaar (ingl k *kilobase pair*)

LiOAc – liitiumatsetaat

mtDNA – mitokondriaalne DNA

NaOAc - naatriumatsetaat

Nat – nourseotritsiin

ncRNA – mittekodeeriv RNA (ingl k *noncoding RNA*)

ORF – avatud lugemisraam (ingl k *open reading frame*)

qRT-PCR – kvantitatiivne pöördtranskriptaasi polümeraasi ahelreaktsioon (ingl k *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

rpm – pööret minutis

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat

SNF rada – mittefermenteeritava süsinikuallika poolt aktiveeruv rada (ingl k *sucrose nonfermentable*)

YPD – pärm rikas sööde: pärmiekstrakt, peptoon, glükoos (ingl k *yeast extract, peptone, dextrose*)

YPG – pärmiekstrakt, peptoon, glütserool (ingl k *yeast extract, peptone, glycerol*)

## Sissejuhatus

Pagaripärm (*Saccharomyces cerevisiae*) on üherakuline eukariootne organism, mis sõltuvalt ümbritsevatest keskkonnatingimustest võib ümber lülituda mitmerakulistele kasvuvormidele. Nii tööstuslikult kui meditsiiniliselt on pärmseente (ja ka teiste mikroorganismide) mitmerakuline kasv oluline. Meditsiinis on suureks probleemiks biokiled, sest nende poolt põhjustatavad infektsioonid on raskesti ravitavad.

Nii nagu paljud patogeensed pärmseened, on ka pagaripärm võimeline algatama biokile teket (Reynolds ja Fink, 2001). Pagaripärmil on patogeensete pärmseentega palju homoloogilisi genee ja konserveerunud signaaliülekannderadu, mistõttu on pagaripärmi puhul tegemist hea mudeliga biokile uurimisel.

Pagaripärm moodustab biokilet kahel erineval moel – kinnitudes abiootilistele pindadele (näiteks plastikule) või moodustades libiseva kasvu tulemusena matjaid kolooniaid (Reynolds ja Fink, 2001). Libisev kasv esineb pooltahkel söötmel ning selle toimumiseks on vajalik *FLO11* ekspressioon. Ei ole väga täpselt teada, kuidas mõjutab matjate kolooniate moodustumist mitokondriaalne DNA (mtDNA). On leitud, et mtDNA mutandid (*rho*-mutandid) ei ole võimelised struktureeritud matjaid kolooniaid moodustama (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013) ning on teada, et *rho*-mutantidel on väga madal *FLO11* ekspressioonitase (Aun jt, 2013).

Käesoleva töö eesmärk oli uurida, kas *FLO11* ekspressioonitaseme suurendamine taastab *rho*-mutantides struktureeritud matjate kolooniate moodustumise. Töö teine suurem eesmärk oli analüüsida geneetilisi interaktsioone hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel.

Töö autor soovib südamest tänada oma juhendajat Tiina Tamme igakülgse abi eest. Suur aitäh!

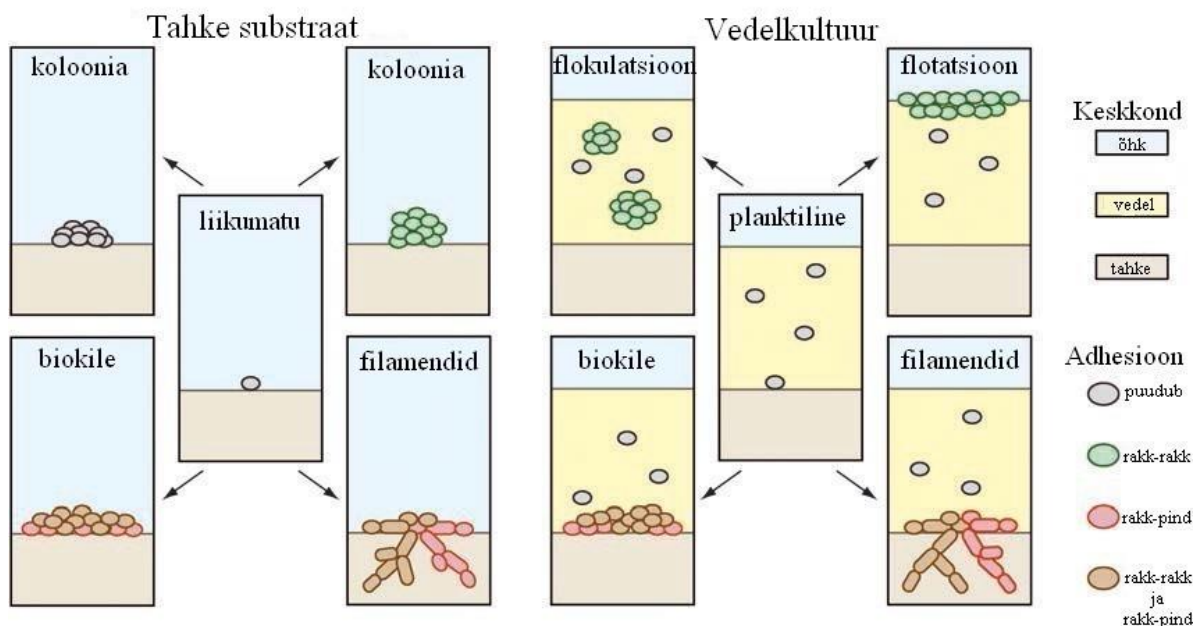
Märksõnad: libisev kasv, *FLO11*, *rho*-mutandid, *Saccharomyces cerevisiae*, geneetilised interaktsioonid

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Pagaripärmi mitmerakuline kasv

Looduslikes tingimustes kasvavad pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*) rakud mitmerakuliste kolooniatena, vaid väga harvadel juhtudel üherakulistena. Esimesed ülevaated pagaripärmi võimest kasvada mitmerakuliste vormidena tehti juba üle saja aasta tagasi (Hansen, 1883), kuid nende dimorfism ei saanud pikka aega laialdasemat tähelepanu. Seda seetõttu, et enamik laboritüvesid kasvavad üherakulistena. Praeguseks uuritakse palju ka mitmerakulisi kasvuvorme, kasutades näiteks  $\Sigma 1278b$  tüve.  $\Sigma 1278b$  tüve tütarrakud ei eemaldu emarakust ning kipuvad omavahel kokku kleepuma. Antud tüves on säilinud *FLO*-geenide ekspressioon, mis on vajalik mitmerakuliseks kasvuks (Liu jt, 1996; Ralser jt, 2012). Pagaripärmi tüvi S288C on genotüübilt lähedane  $\Sigma 1278b$ -ga, ent ei sobi mitmerakuliste kasvuvormide uurimiseks, sest tema genoomis on mutatsioon *FLO8* geenis (Liu jt, 1996; Kobayashi jt, 1999), mille poolt kodeeritav valk Flo8 on transkriptsiooniline aktivaator teistele *FLO*-geenidele (*FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*).

Pagaripärmi mitmerakuliste kasvuvormide puhul eristatakse põhiliselt filamentset kasvu, biokile teket ning tööstuslikes protsessides olulisi flokulatsiooni ja flotatsiooni (joonis 1).



**Joonis 1.** Pagaripärmi rakkude erinevad kasvuvormid. Vasakul on kasv tahkel substraadil ja paremal vedelkultuuris. Joonisel on näidatud nii üherakuline kui mitmerakuline kasv. Erinevate värvidega on tähistatud kasvukeskkond ja rakkude adhesioon. Joonis on modifitseeritud Brückner ja Mösch, 2012 järgi.

### 1.1.1 Filamentne kasv

Filamentne kasv on liigist sõltuv kasvuvorm, mis kujutab endast nii hüüfide kui pseudohüüfide teket. Enamik pärmseeni on võimelised filamenteeruma. Vaid viiel pärmseente perekonna (*Citeromyces*, *Schizoblastosporion*, *Trigonopsis*, *Whikerhamiella* ja *Wingea*) liikidel puudub filamenteerumisvõime (Vallejo jt, 2013). Laialdasemalt on filamenteerumist uuritud patogeensetel pärmidel, näiteks *Candida albicans*'il, kuna selline kasvuvorm on oluline virulentsusel (Cullen ja Sprague, 2012). Pagaripärm on samuti võimeline filamentselt kasvama. Ta ei ole võimeline moodustama tõelisi hüüfe, kuid see-eest moodustab pseudohüüfe. Viimaseid kirjeldatakse kui pärast pungumist moodustunud pikenenud rakkude ahelaid (Gimeno ja Fink, 1992; Gimeno jt, 1992; Kron jt, 1994). Selline kasvutüüp annab pärmirakkude kolooniale võimaluse levida suuremal pindalal, sealjuures biomassi kasvatamata.

Filamenteerumine esineb nii haploidsetel kui diploidsetel pagaripärmi rakkudel, kuid pseudohüüfide moodustumine on neil mõnevõrra erinevalt reguleeritud. Diploididel kutsub filamenteerumist esile lämmastikunälg (Wright jt, 1993; Dickinson, 1996). Haploididel kutsuvad filamentset kasvu esile lühikese ahelaga alhokolid koos lämmastikunäljaga (Dickinson, 1996; Lorenz jt, 2000; Chen ja Fink, 2006). Sellisteks alkoholideks on näiteks butanool, isobutanool ja isoamüülalkohol, mis tekivad aminohapete katabolismi (vastavalt leutsiini, isoleutsiini ja valiini) tagajärjel siis, kui toitained saavad limiteerivaks. On näidatud, et nendel pseudohüüfsetel rakkudel, mis on indutseeritud isoamüülalkoholi poolt, on suurenenud mitokondrite hulk ning kitiini sisaldus rakukestas (Kern jt, 2004). Arvatavasti toimub pseudohüüfsete rakkude mitokondrite hulga suurenemine seetõttu, et rakk valmistab end ette erinevate uute substraatide oksüdeerimiseks. Samas kitiini hulga suurenemine rakukestas arvatakse olevat vajalik pseudohüüfide jäigemaks muutumisel.

On näidatud, et diploidide pseudohüüfid on suunatud kolooniast eemale, samas kui haploidide filamendid ei ulatu eriti kolooniast kaugemale (Gancedo, 2001).

Pseudohüüfisel kasvul toimuvad muudatused nii rakutsükli kui pungumismustris (Kron jt, 1994; Rua jt, 2001). Kui diploidid punguvad tavapäraselt bipolaarselt ja haploidid aksiaalselt, siis filamenteerudes muutub mõlemate pungumismuster unipolaarseks. Unipolaarselt pungudes muutub rakutsükli G2-faas pikemaks. Seetõttu toimub mitoos alles siis, kui tütarakk on kasvanud emarakuga sama suureks ning rakujagunemine on sümmeetriline. Selle tulemusena saavad mõlemad rakud alustada järgmist rakujagunemist sünkroonselt. Rakkude kuju ja aktiini tsütoskeleti pikenemine on kooskõlas pikenenud G2-faasiga. Kuna pikenenud rakud jäävad pärast pungumist ühendatuks, on rakkude ahelatel näha selged ahenenud

septumi kohad. Rakkude pikkuse ja laiuse suhe on pseudohüüfidel suurem kui kaks (Kron jt, 1994; Schröder jt, 2000).

Üks filamentse kasvu vormidest on ka invasiivne kasv, mis kujutab endast rakkude koloniaalset kasvamist nii söötmel kui ka rakkude tungimist söötme sisse (Roberts ja Fink, 1994; Cullen ja Sprague, 2000). Selline kasvutüüp esineb haploidsetel pärmirakkudel fermenteeritava süsinikuallika puudumisel. Nii nagu pseudohüüfisel kasvul, toimub ka invaseerumisel pungumismustri muutus. Pungumine muutub sellisel juhul aga bipolaarseks (Cullen ja Sprague, 2000). Invasiivne kasv on tugevalt sõltuv Flo11-st (Guo jt, 2000). Flo11 vajalikkust on näidatud ka pseudohüüfisel kasvul (Gimeno jt, 1992; Lambrechts jt, 1996; Lo jt, 1998).

### 1.1.2 Biokile

Biokilesid kirjeldatakse kui pinnale kinnitunud rakkude kogumeid, mis on ümbritsetud ekstratsellulaarse matriksi ehk rakuvaheaine poolt (ingl k *extracellular matrix*, ECM) (Costerton jt, 1999). Biokile moodustamine võimaldab uute alade koloniseerimist ning paljud pärmseened kasutavad seda ära patogeneesis. Patogeensed mikroorganismid saavad biokilede näol võimaluse kasvada meditsiinivahenditel, näiteks proteesidel ja kateetritel, põhjustades infektsioone. Biokiled on väga resistentsed erinevate antimikroobsete ainete suhtes, mistõttu on biokilede poolt põhjustatud infektsioonid raskesti ravitavad (Kojic ja Darouiche, 2004; Kim ja Sudbery, 2011). Seega on biokiled meditsiinis suureks probleemiks.

Küps biokile areneb välja läbi mitme etapi (ülevaade Donlan ja Costerton, 2002). Esimene etapp on adhesioon pinnale, mis võib olla nii biootiline kui abiootiline. Rakkude järjestikusel kinnitumisel nii pinna kui teiste rakkude külge hakkab toimuma biokile küpsemine. Moodustub tihe rakkude kiht, mida kutsutakse ka mikrokolooniaks. Nimetatud kiht ümbritsetakse rakuvaheainega ning mikrokolooniast areneb küps biokile. Biokile tekke viimaseks etapiks võib lugeda biokilest eraldumist. Kuigi pagaripärmi puhul pole biokile teke nii hästi kirjeldatud kui bakteritel, arvatakse siiski, et tekkemehhanismilt on nii pärmide kui bakterite biokilede moodustumine sarnane (Vachova jt, 2011).

Elektronmikroskoopia abil on pagaripärmil näidatud ekstratsellulaarse matriksi olemasolu (Kuthan jt, 2003; Beauvais jt, 2009). On leitud, et see koosneb suures osas sahhariididest, peamiselt mannoosist ja glükoosist (Beauvais jt, 2009). Matriks sisaldab ka olulist rakukesta komponenti,  $\beta$ -1,3-glükaani (Kim ja Sudbery, 2011). Rakuvaheaine funktsiooniks pakutakse kaitset antifungaalsete ainete eest (Beauvais jt, 2009; Vachova jt, 2011). Peale selle võib



maatriksi sisene ruum olla kohaks, kus talletada toit- ja jääkaineid (Kuthan jt, 2003), sarnaselt bakterite rakuvaheainega. Ekstratsellulaarne maatriks seob ka omavahel kõrvuti asetsevaid rakke, olles seega väga oluline lüli, et rakud saaksid omavahel hulgatunnetuse kaudu suhelda. Hulgatunnetus toimib läbi väikeste molekulide, mida nimetatakse autoinduktoriteks. Pagaripärmi rakud kasutavad autoinduktorina ammooniumi (Palkova jt, 1997; Čap jt, 2010). Ammooniumi tootmisega muutub keskkonna pH aluseliseks, mis mõjub rakkude kasvule inhibeerivalt. Lisaks toimivad autoinduktoritena veel etanool, trüptofool ning fenüületanool (Chen ja Fink, 2006; Smukalla jt, 2008). Kuigi hulgatunnetuse kaudu suhtlemine on pagaripärmi rakkude puhul küll kirjeldatud, pole selle osalus biokile arengus päris täpselt teada.

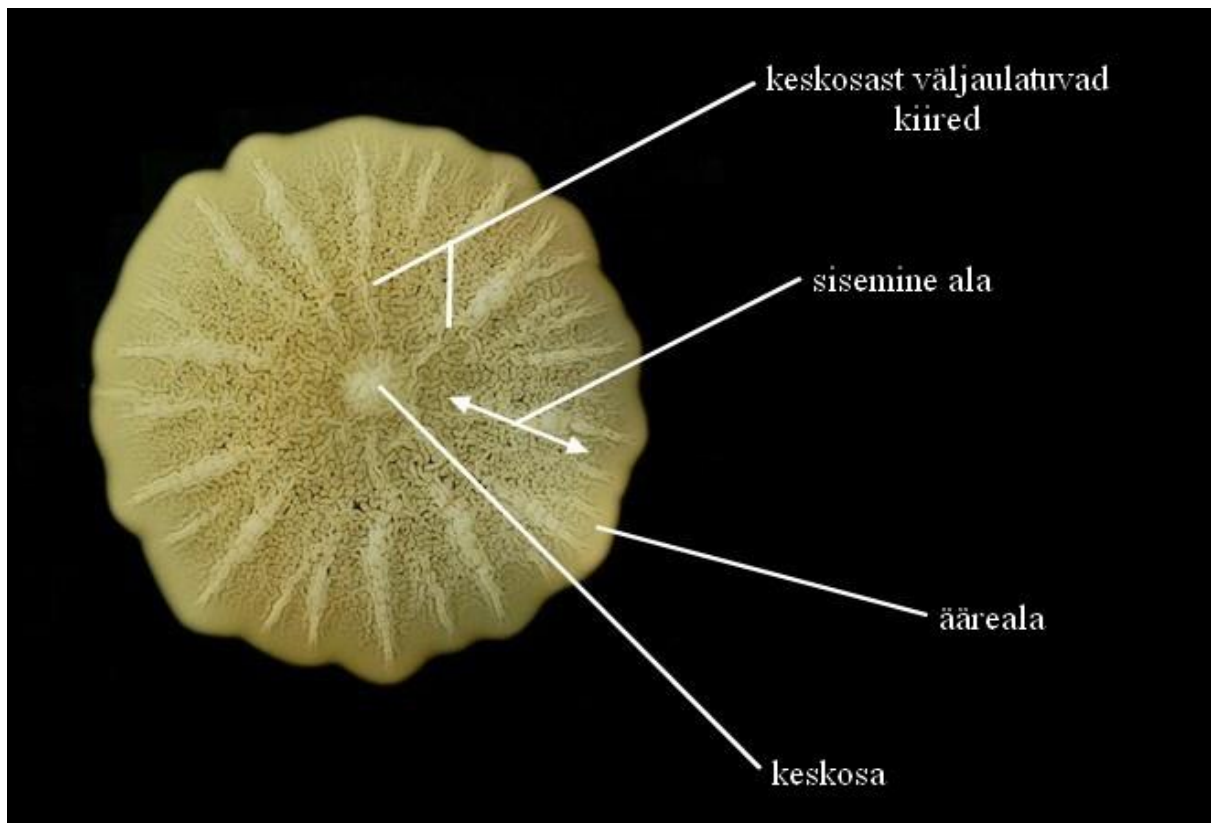
Pagaripärmil on kirjeldatud kaht erinevat tüüpi biokile tekke võimalust (Reynolds ja Fink, 2001). Üks võimalus on kinnituda tahketele abiootilistele pindadele nagu näiteks plastik. Teise võimalusena on kirjeldatud libisevat kasvu pooltahke söötme pinnal.

#### **1.1.2.1 Adhesioon plastikule**

Pagaripärmil on näidatud adhesioonivõimet nii polüstüreeni, polüpropüleeniga kui ka polüvinüülkloriidi pinnale (Reynolds ja Fink, 2001). Enim on uuritud kinnitumist polüstüreenile. Plastikule adhesiooni saab laboritingimustel kutsuda esile glükoosinälgjaga ning kinnitumiseks peetakse eriti oluliseks Flo11 hüdrofoobseid omadusi (Reynolds ja Fink, 2001). Samas on näidatud, et *FLO11* ekspresseerivad laboritüved kinnituvad plastikule sõltumata sellest, kas pind on hüdrofoobne või hüdrofiilne (Purevdorj-Gage jt, 2007). Seega ei ole plastikule adhesioon ainuüksi sõltuv Flo11 hüdrofoobsetest omadustest.

#### **1.1.2.2 Libisev kasv**

Pagaripärmil esineb libisev kasv pooltahkel pinnal, 0,3% agari kontsentratsioonil (Reynolds ja Fink, 2001). Libiseva kasvu tulemusena tekivad matjad struktuurid/kolooniad (ingl k *mats*). Matja struktuuri kasvamise käigus arenevad välja kaks visuaalselt erinevat rakupopulatsiooni – koloonia ääreala (*rim*) ning sisemine ala (*hub*). Sisemine piirkond koosneb kanalitest ja kortsulistest struktuuridest ning koloonia keskosast ulatuvad väljapoole kiired. Perifeeriasse jääv ala on aga sile (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008) (joonis 2).



**Joonis 2.** Pagaripärmi matja struktuuriga koloonia. Koloonia ääreala rakud on sileda morfoloogiaga, sisemise ala rakud moodustavad kanaleid ja kortsulisi struktuure. Koloonia keskosast ulatuvad välja kiired. Joonisel on kujutatud  $\Sigma 1278b$  metsiktüüpi haploidse *MATa* paarumistüübiga tüve matjat kolooniat.

Nimetatud struktuurid arenevad tänu söötmel tekkinud glükoosi ja pH gradiendile (Reynolds jt, 2008). Glükoosi kontsentratsioon on kõrgem koloonia ääres ja madalam matja koloonia sisemises alas. Matja koloonia arenedes langeb glükoosi kontsentratsioon söötmel lõpuks 0%-ni. Kui see gradient rikkuda, on matja koloonia struktuuride arenemine häiritud. Kuna glükoosi kontsentratsioon matja struktuuri sisemises alas väheneb, on sisemiste rakkude kasvukiirus oluliselt madalam, samas mati servas säilib rakkude aktiivne kasv. Sarnaselt glükoosi gradiendile tekib ka pH gradient. Matja koloonia arenedes söötme pH langeb. On leitud, et kõige paremini ilmnevad matjad struktuurid pH väärtusel 4,9. Kõrgemad pH väärtused takistavad matile omaste struktuuride moodustumist ning tekkiv koloonia on sile.

Matja struktuuri morfoloogiat mõjutavad haploidsetel rakkudel ka paarumistüüp ja ploidsus (Reynolds ja Fink, 2001). *MATa* paarumistüübiga rakkude moodustatavatel mattidel on rohkem keskosast väljaulatuvaid kiiri kui *MATa* paarumistüübiga rakkudel.

Kõige suuremaid ja struktureeritumaid matte moodustavad haploidid. Ploidsuse suurenedes (kuni tetraploidideni) mati suurus ja struktureeritus vähenevad.

Matja koloonia moodustumine on suuresti sõltuv *FLO11* ekspressioonist. On näidatud, et kui *FLO11* deleteerida, on matja koloonia teke häiritud (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012). *FLO11* ekspressioon säilib matjas koloonias sõltumata sellest, kas tegemist on mati äärealal või sisemises alas paiknevate rakkudega (Reynolds jt, 2008). Samas arvatakse, et ainuüksi *FLO11* ekspressioonist ei piisa matja koloonia moodustumiseks. Näiteks on leitud, et vakuolaarsete valkude sorteerimise (ingl k *vacuolar protein sorting*, VPS) geenid on samuti olulised mati moodustumiseks, mõjutades otseselt või kaudselt *FLO11* ekspressiooniks vajalikke signaaliülekanalaid (Sarode jt, 2011).

### 1.1.3 Ülegenoomsed uuringud ja mitmerakuline kasv

2008. aastal avaldati ülegenoomne uuring pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  tüve kohta, milles uuriti geene, mis võiksid olla olulised haploidseks pseudohüüfseks kasvuks (Jin jt, 2008). Uuringu tulemusena leiti, et 478 geeni deleteerimine ja/või üleekspressioon põhjustas defekte haploidse pseudohüüfse kasvuks. Kokku analüüsiti 4528 geeni, mis teeb umbes 78% kõikidest pagaripärmi geenidest.

Neli aastat hiljem avaldati ülegenoomne töö, milles analüüsiti samuti pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  tüve geene, mis võiksid olla seotud mitmerakulise kasvuga (Ryan jt, 2012). Ent selles töös analüüsiti võimalikke olulisi geene diploidide pseudohüüfseks kasvuks, haploidide invasiooniks ja/või matjate struktuuride moodustumiseks. Uuringu tulemusena leiti vastavalt 700, 577 ja 688 geeni, mis võiksid mõjutada nimetatud mitmerakuliste kasvuvormide teket.

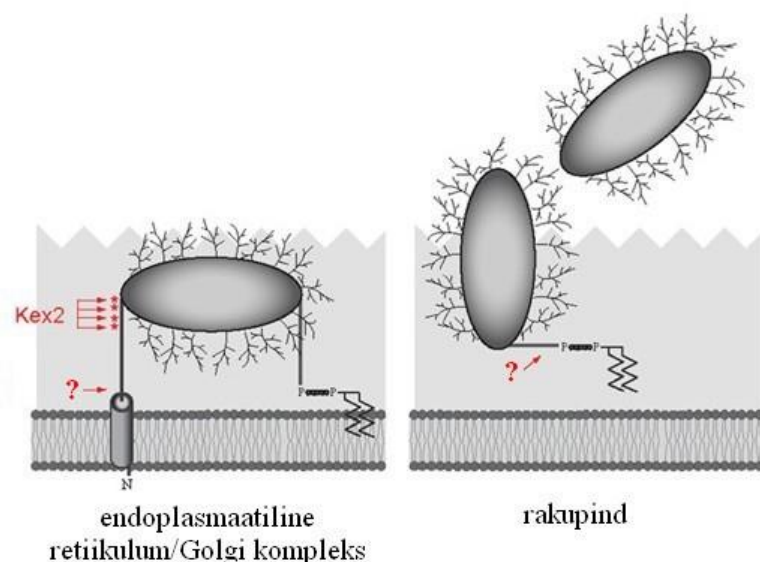
Viimati nimetatud uuringus arvutati matjate kolooniate moodustumisel kolooniate pindalade suhted, millega määrati, kas uuritava geeni deletsioon põhjustab hüper- või hüpomatja struktuuri teket (Ryan jt, 2012). Deletsioonimutantide pindalade suhted arvutati metsiktüüpi koloonia pindala suhtes. Hüpermatjaks loeti need kolooniad, mille pindalade suhe oli  $\geq 26$  ning hüpomatjaks need, mille suhe oli  $\leq -26$ . Leiti, et 688-st potentsiaalsest matja koloonia teket mõjutavast geenist põhjustavad hüpomatjate struktuuride teket 655 ning hüpermatjaid struktuure 33 deletsioonimutanti.

## 1.2 *FLO11* ja selle poolt kodeeritav rakupinna adhesiin

*FLO11* on 4104 nukleotiidi pikk (Lo ja Dranginis, 1996). Selle geeni poolt kodeeritakse 1367 aminohappe pikkust adhesiini Flo11, mis on vajalik biokile tekkeks (Reynolds ja Fink, 2001), filamenteerumiseks (Roberts ja Fink, 1994; Lambrechts jt, 1996; Lo ja Dranginis, 1998; Cullen ja Sprague, 2000) ja flotatsiooniks (Zara jt, 2005; Ishigami jt, 2006).

Adhesiinide näol on tegemist rakupinnal paiknevate glükoproteiinidega, millel on lisaks signaalpeptiidile kolm põhilist domeeni – N-terminaalne, keskmine ja C-terminaalne domeen (Lo ja Dranginis, 1996; Caro jt, 1997; Dranginis jt, 2007). N-terminaalne domeen vastutab ligandi seostumise eest. Keskmine domeen on väga seriini-, treoniini- ja proliinirikas, sisaldab suurel määral kordusjärjestusi ning on väga tugevalt glükosüleeritud (Verstrepen jt, 2005; Dranginis jt, 2007). Keskmise domeeni ülesandeks on esitleda N-terminaalset domeeni rakupinnal. C-terminaalsele domeenile lisatakse endoplasmaatilises retiikulumis glükosüülfosfatidüülinoositol-ankur (GPI-ankur). GPI-ankru vahendusel toimub kinnitumine membraani lipiididesse kaksikkihti või seondumine  $\beta$ -1,6-glükaanidega rakukestas (Frieman ja Cormack, 2004). C-terminus võib sisaldada ka transmembraanset osa, kuid Flo11-l see puudub (Douglas jt, 2007).

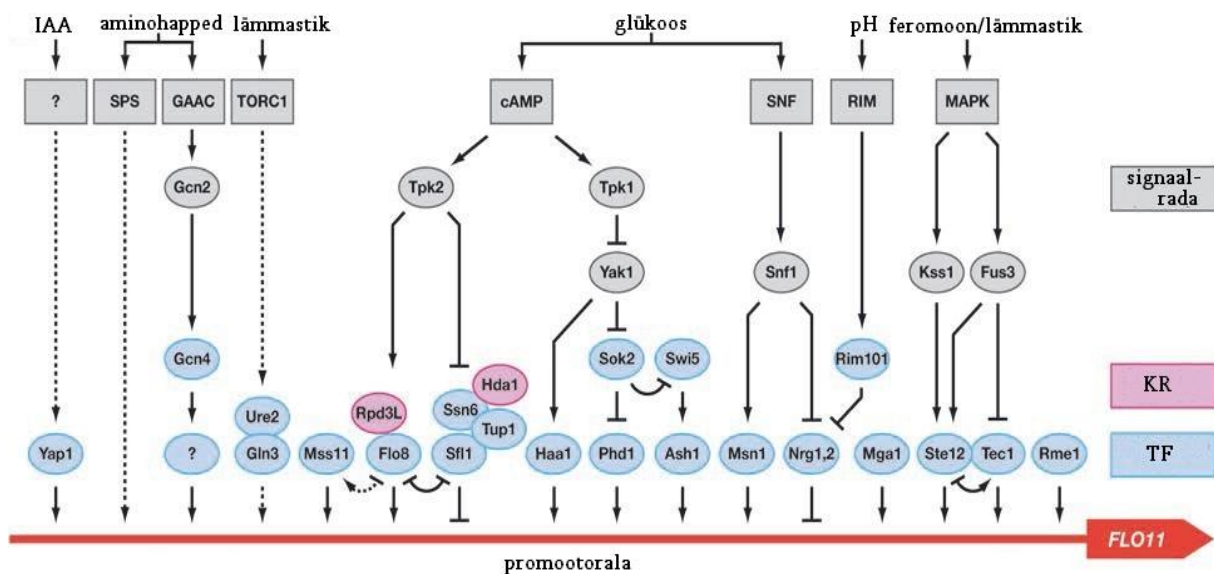
On näidatud, et translatsioonijärgselt Flo11 modifitseeritakse (joonis 3). Posttranslatsiooniliselt lõigatakse Flo11 ligikaudu 120 aminohappe kauguselt N-terminaalsest osast (Karunanithi jt, 2010) ning seda lõikamist vahendab furiinproteas Kex2. Lõikamine teostatakse Golgi kompleksis ning oletatavasti toimuvad veel teised lõikamised, mille järel Flo11 rakukesta küljest vabastatakse. Ilmselt lõigatakse teiste glükoproteaaside poolt lahti C-terminuses paiknev GPI-ankur, kuid seda tehakse vaid sõltuvalt konkreetsest olukorrast. Näiteks juhul kui rakud moodustavad matjaid struktuure, lõigatakse Flo11 rakukesta küljest lahti ning sekreteeritakse ümbrusesse, et rakud saaksid voolavalt kasvada. Juhul kui rakud kinnituvad pindadele, siis Flo11 rakukestast lahti ei lõigata. Hiljuti näidati, et ka Vps-valgud osalevad Flo11 posttranslatsioonilises lõikamises ning mõjutavad sellega Flo11 üleüldist regulatsiooni (Sarode jt, 2011).



**Joonis 3.** Flo11 posttranslatsioonilise modifitseerimise mudel. Vasakul on näidatud Kex2 poolt teostatav lõikamine Flo11 N-terminaalses osas ning paremal on näidatud, et Flo11 vabastatakse rakupinnalt pärast modifitseerimisi. Punaste küsimärkidega on tähistatud teised oletatavad translatsioonijärgsed lõikamiskohad. Joonis on modifitseeritud Karunanithi jt, 2010 järgi.

### 1.2.1 *FLO11* promootori regulatsioon

Võrreldes pagaripärmi geenide keskmise promootorala pikkusega, mis on 0,3 kb (Dujon, 1996), on *FLO11* geeni promootorala umbes kümme korda pikem, ligikaudu 3 kb (Rupp jt, 1999). Tegemist on pikima kirjeldatud promootoriga pagaripärmi genoomis. Suure promootorala tõttu on *FLO11* ekspressiooni transkriptsiooniline kontroll keeruline ning seda reguleerivad mitmed signaaliülekanalad. Neist põhilised on tsüklilise adenosinmonofosfaadi-proteiinkinaas A (ingl k *cyclic adenosine monophosphate protein kinase A*, cAMP-PKA), filamenteerumisspetsiifilise mitogeeni poolt aktiveeritava proteiinkinaasi (ingl k *filamentous growth specific mitogen-activated protein kinase*, FG MAPK), rapamütsiini-sihtmärk (ingl k *target of rapamycin*, TOR), mittefermenteeritava süsinikuallika poolt aktiveeritav (ingl k *sucrose nonfermentable*, SNF) ja Rim101 valgust sõltuv (RIM) rada (joonis 4). Lisaks transkriptsioonilisele regulatsioonile on *FLO11* promootori regulatsioonis oluline roll ka epigeneetilisel regulatsioonil (joonis 4).



**Joonis 4.** *FLO11* promootorala regulatsioon. Erinevad signaalid aktiveerivad erinevaid transkriptsioonifaktoreid. IAA tähistab indooläädikhapet. Signaaliülekanderajad on tähistatud hallilt, radu reguleerivad transkriptsioonifaktorid (TF) siniselt ning epigeneetilisel regulatsioonis osalevad kromatiini remodelleerijad (KR) roosalt. Nooded tähistavad positiivseid regulaatoreid, riskriipsud negatiivseid regulaatoreid. Küsimärkidega on tähistatud seni teadmata transkriptsioonifaktorid. Joonis on modifitseeritud Brückner ja Mösch, 2012 järgi.

### 1.2.1.1 Transkriptsiooniline regulatsioon

Matjate kolooniate moodustumiseks on olulised pooltahkel söötmel tekkivad glükoosi- ja pH gradient (Reynolds jt, 2008). Sellest lähtuvalt on matjate kolooniate puhul *FLO11* regulatsioonis olulised cAMP-PKA, SNF ja RIM signaaliülekanderajad.

cAMP-PKA ja SNF signaaliülekanderajad on pagaripärmis reguleeritud fermenteeritavate süsinikuallikate (näiteks glükoosi) poolt. cAMP-PKA raja puhul aktiveeritakse süsinikuallika näljas rakuväline Gpr1-Gpa2 retseptorsüsteem. Samas toimub süsinikunäljas ka rakusiseses pH langus, mis aktiveerib GTP-d siduva Ras2 valgu (Toda jt, 1985; Kübler jt, 1997; Lorenz ja Heitman, 1997; Pan ja Heitman, 1999). Järgnevalt aktiveeritakse adenülaattsüklaas Cyr1, mistõttu hakkab rakkudes tõusma cAMP tase. cAMP kontsentratsiooni tõustes aktiveeritakse omakorda proteiinkinaas A (PKA). Aktivatsioon toimub seeläbi, et PKA regulatoorne subühik Bcy1 seostub cAMP-ga ning selle tõttu vabanevad PKA katalüütilised subühikud Tpk1, Tpk2 ja Tpk3. Katalüütilised subühikud Tpk1 ja Tpk2 on olulised *FLO11* ekspressiooni regulatsioonis (Robertson ja Fink, 1998; Pan ja Heitman, 1999; joonis 4). Kui muidu takistab

*FLO11* ekspresseerumist Sfl1, siis Tpk2 fosforüleeib Sfl1 ja sellega inhibeerib seda. Tpk2 fosforüleeib ka Flo8, mis on selle tulemusena aktiivne ja käitub kui *FLO11* transkriptsiooniline aktivaator. Tpk1 inhibeerib Yak1. Aktiivne Yak1 on vajalik Sok2 fosforüleerimiseks. Sok2 on *FLO11* ekspressiooni negatiivne regulaator, mis represserib transkriptsioonifaktorit Phd1 (Gimeno ja Fink, 1994; Pan ja Heitman, 2000). Yak1 osaleb lisaks Haa1 aktiveerimises. Haa1 on samuti *FLO11* ekspressiooni positiivne regulaator (Malcher jt, 2011).

SNF rada aktiveerub samuti fermenteeritava süsinikuallika näljas. Sellisel juhul fosforüleeritakse Snf1 (Hedbacker ja Carlson, 2008), mis on sellisel kujul aktiivne ning võimeline aktiveerima Msn1, samal ajal represserides Nrg1 ja Nrg2. Msn1 on *FLO11* ekspressiooni positiivne regulaator, samas kui Nrg1 ja Nrg2 reguleerivad *FLO11* ekspressiooni negatiivselt (Kuchin jt, 2002; Vyas jt, 2003).

RIM rada käivitub pagaripärmi rakkudes siis, kui ümbritseva keskkonna pH tõuseb. Aluselise pH toimel aktiveeritakse Rim20, mis on vajalik Rim101 proteolüütiliseks lõikamiseks (Lamb jt, 2001). Protsessitud Rim101 on transkriptsiooniliselt aktiivne. Aktiivne Rim101 represserib *FLO11* negatiivseid regulaatoreid Nrg1 ja Nrg2 (Lamb ja Mitchell, 2003; Barrales jt, 2008), mida võidakse represserida ka eelnevalt kirjeldatud SNF raja kaudu.

### 1.2.1.2 Epigeneetiline regulatsioon

*FLO11* epigeneetiline regulatsioon toimib vähemalt läbi kahe mehhanismi. Üks nendest sõltub transkriptsioonilisest regulaatorist Sfl1 ja histooni deatsetülaasist Hda1. Kuna Sfl1 seondub otseselt *FLO11* promootoralale, siis arvatakse, et just see tagab promootori spetsiifilisuse epigeneetiliseks vaigistamiseks Hda1 poolt (Halme jt, 2004). Ilmselt tulevad Snf1 poolt signaalid, mille tõttu Hda1 seondub Tup1/Ssn6 kompleksiga, mille tulemusena saab vaigistamine aset leida (Conlan ja Tzamarias, 2001). Lisaks promootori-spetsiifilisele signaalile, mida vahendab Snf1, tagab *FLO11* vaigistamise ka tema genoomne positsioon. Nimelt paikneb *FLO11* IX kromosoomi paremas õlas tsentromeeri lähedal (Lo ja Dranginis, 1996). Samas pole täpselt teada, millised positsionaalsed tegurid vaigistamise tagavad (Brückner ja Mösch, 2012).

Teine mehhanism *FLO11* epigeneetiliseks regulatsiooniks toimib läbi Rpd3L ja kahe mittekodeeriva RNA (ingl k *noncoding RNA*, ncRNA) (Bumgarner jt, 2009; Barrales jt, 2012; Bumgarner jt, 2012). Rpd3L puhul on samuti tegemist histooni deatsetülaasi kompleksiga,

kuid mõnevõrra üllatuslikult on tegemist hoopis *FLO11* aktivaatoriga. Rpd3L poolt toimib vaigistamine läbi kromatiini kondenseerumise, mis leiab aset *FLO11* promootori ülesvoolu osas, kus paiknevad seondumissaidid Sfl1 ja Flo8-le. Selle tõttu blokeeritakse Sfl1 ligipääs *FLO11* promootorile, kuid samal ajal soodustatakse Flo8 seondumist. Nii saavad ekspresseeruda ka ncRNA-d, mis viivad lõpuks *FLO11* ekspressioonini.

Lisaks kahele eelnevalt kirjeldatud mehhanismile võib *FLO11* promootoralas toimuda ka kromatiini remodelleerimine läbi SWI/SNF kompleksi (Barrales jt, 2008; Barrales jt, 2012). Nimetatud kompleksi poolt toimub nukleosoomide liigutamine DNA-l ning selleks vajatakse ATP-d. SWI/SNF kompleksi poolt teostatav remodelleerimine muudab kromatiini struktuuri, mille tõttu *FLO11* aktiveeritakse.

### **1.3 Pagaripärmi mitokondriaalne DNA**

Eukarüootsetele rakkudele omaselt on pagaripärmi mitokondr ümbritsetud kaksikmembraaniga ning omab tuumast eraldiseisvat genoomi. MtDNA hõlmab kogu pagaripärmi DNA-st ligikaudu 15%, mis vastab haploidses rakus umbes 50-le mtDNA koopiale (Williamson, 2002). Pagaripärmi mitokondrites paikneb DNA nukleoidina ehk see on pakitud DNA-valk kompleksi (Miyakawa jt, 1984).

Funktsionaalse mtDNA säilimiseks on vajalikud enamasti tuuma genoomi poolt kodeeritavad valgud, mis tuleb mitokondritesse transportida. Neid valke, mida tuleb mitokondritesse transportida, on pagaripärmil vähemalt 500 (Perocchi jt, 2006). Vaid vähesed valgud kodeeritakse mitokondriaalse genoomi enda poolt. Pagaripärmi mtDNA poolt kodeeritakse kaheksat erinevat valku, mis on peamiselt seotud energia tootmisega. Nendeks on kolm ATP süntaasi subühikut (Atp6, Atp8 ja Atp9), tsütokroom c kolm subühikut (Cox1, Cox2 ja Cox3), apotsütokroom b (Cytb) ning ribosomaalne valk Var1. Lisaks nendele kaheksale valgule kodeerib mitokondriaalne genoom ka 15S ja 21S rRNA-d, 24 tRNA molekuli, mis on võimelised ära tundma kõiki koodoneid, ja 9S RNA komponenti RNAas P-st (Foury jt, 1998).

Mitokondri sisemembraanil toimub raku varustamine energiaga, täpsemalt oksüdatiivne fosforüleerimine, mille käigus toodetakse ATP-d. Pagaripärm on aga fakultatiivne anaeroob, mistõttu talub ta mtDNA puudumist. Seda sel põhjusel, et fermenteeritava süsinikuallika olemasolul saab ta kogu vajaliku energia kätte glükolüüsi teel.



### 1.3.1 *Rho*-mutandid

Pagaripärmi mtDNA olemasolu või puudumise järgi võib rakke jagada kolmeks rühmaks (Faye jt, 1973; Contamine ja Picard, 2000). Kui mtDNA on funktsionaalne, nimetatakse rakke  $\rho^+$ . MtDNA mutante võib omakorda jagada kaheks:  $\rho^-$ , kui tegemist on osaliselt säilinud, kuid mittefunktsionaalse mtDNA-ga, ja  $\rho^0$ , kui mtDNA puudub täielikult.  $\rho^-$  ja  $\rho^0$  rakke koos kutsutakse *rho*-mutantideks.

*Rho*-mutantidel puudub mitokondriaalse genoomi poolt kodeeritavate valkude süntees (Faye jt, 1973; Contamine ja Picard, 2000). Nende mitokondrites ei toimi elektrontransportahel ega toimu oksüdatiivset fosforüleerimist, mis tähendab, et mtDNA mutandid ei suuda aeroobselt hingata. Seega pole *rho*-mutandid võimelised kasvama keskkonnas, kus puudub fermenteeritav süsinikuallikas. Näiteks ei kasva nad söötmel, mis sisaldab süsinikuallikana glütserooli. Fermenteeritava süsinikuallikaga (näiteks glükoosiga) söötmel suudavad nad edukalt kasvada, kuid moodustavad funktsionaalse mtDNA-ga  $\rho^+$  rakkudest pisemaid kolooniaid. Viimaseid kutsutakse ka *petite* kolooniateks (Faye jt, 1973).

#### 1.3.1.1 *Rho*-mutantide filamentne kasv

Ülegenoomsete uuringutega on näidatud, et pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  tüve *rho*-mutantidel on defektsed nii pseudohüüfne kui invasiivne kasv (Lorenz jt, 2000; Kang ja Jiang, 2005; Jin jt, 2008; Ryan jt, 2012). Detailsemalt on mtDNA mutantide filamenteerumist veel vähe uuritud. 2013. aastal avaldatud uuringus näidati, et *rho*-mutantidel esineb küll mõningal määral pseudohüüfset kasvu, kuid võrreldes  $\rho^+$  rakkudega tekib hargnevaid filamente oluliselt vähem (Aun jt, 2013). Lisaks leiti, et *rho*-mutantidel on defektne invasiivne kasv. Põhjalikum analüüs näitas, et defektid filamenteerumises on põhjustatud *FLO11* ekspressiooni puudumisest. Kui *FLO11* üleekspresseeriti, taastusid mõlemad filamentse kasvu vormid.

Uuritud on ka *FLO11* ekspressiooni mõjutavate signaaliülekanderadade (täpsemalt FG MAPK ja cAMP-PKA raja) seost defektse mtDNA-ga (Aun jt, 2013). Kui FG MAPK rada inaktiveeriti, kaotasid *rho*-mutandid filamenteerumisvõime täielikult. Juhul kui inaktiveeriti cAMP-PKA rada, oli filamenteerumine defektne. Kui rada aktiveeriti, taastusid nii pseudohüüfne kui ka invasiivne kasv. Lisaks näidati samas uuringus ka seda, et *rho*-mutantidel on cAMP-PKA rada alla reguleeritud, mis suure tõenäosusega põhjustabki *FLO11* ebapiisava ekspresseerumise.

### 1.3.1.2 *Rho*-mutantide biokile teke

On avaldatud üks ülegenoomne töö, milles on muuhulgas analüüsitud *rho*-mutantide matjate struktuuride teket (Ryan jt, 2012). Nimetatud uuringust selgus, et *rho*-mutandid ei suuda struktureeritud matjaid kolooniad moodustada.

Lisaks eelnevalt nimetatud ülegenoomsele tööle on näidatud ka detailsemalt, et *rho*-mutandid ei moodusta matjaid kolooniaid (Kruuse, 2013). Analüüsitud on nii *MIPI* kui ka *RPO41* deletsioonimutante. *MIPI* poolt kodeeritakse mtDNA polümeraasi, mille deleteerimisel muutub  $rho^+$  rakk  $rho^0$ -ks (Foury, 1989). Erinevalt *MIPI* deleteerimisest, ei kaota *RPO41* deleteerimisel rakud mtDNA-d täielikult, vaid muutuvad  $rho^-$ -ks. *RPO41* kodeerib mitokondriaalse RNA polümeraasi katalüütilist subühikut (Greenleaf jt, 1986).

Nimetatud *rho*-mutantide matjate struktuuride moodustamist uuriti pikema aja vältel ning leiti, et nad ei moodusta  $rho^+$  rakkudega sama suuri ja struktureeritud matte ka 36 päevaga (Kruuse, 2013). Nii  $rho^-$  kui  $rho^0$  rakkude matjad struktuurid olid siledad ning suuruselt peaaegu identsed.

*Rho*-mutantidel on uuritud ka cAMP-PKA signaaliülekanderaja seost matjate struktuuride moodustamisega (Kruuse, 2013). Kui *rho*-mutantide rakkudest deleteeriti cAMP-PKA raja komponent *SFL1*, siis muutusid nii matja koloonia struktuur kui suurus. Suuruselt olid matid väiksemad, kuid matja koloonia serv muutus sakilisemaks ning moodustunud koloonia oli kõrgem kui tavapärastel *rho*-mutantidel. Kui deleteeriti cAMP-PKA raja komponent *TPK2*, siis see *rho*-mutantide matja koloonia struktuurile ega suurusele mõju ei avaldanud.

Uuritud on ka *rho*-mutantide adhesioonivõimet plastikule, mis on pagaripärmi rakkudel teine võimalus biokile moodustamiseks (Mitt, 2013). Leiti, et *rho*-mutandid kinnituvad polüstüreenile äärmiselt nõrgalt, 6-20 korda nõrgemini kui  $rho^+$  rakud. Tähtsust ei omanud ka see, kas tegemist oli  $rho^-$  või  $rho^0$  rakkudega. Lisaks uuriti, kuidas mõjutab *FLO11* üleekspressioon *rho*-mutantide adhesioonivõimet. Selgus, et *FLO11* üleekspressioon küll suurendas *rho*-mutantide adhesioonivõimet polüstüreenile, ent ei taastanud seda  $rho^+$  rakkudega samale tasemele.

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  metsiktüüpi tüve rakud moodustavad pooltahkel söötmel libiseva kasvu tulemusena matjaid struktuure (Reynolds ja Fink, 2001), mille tekkeks on oluline *FLO11* ekspressioon (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012).

2012. aastal avaldatud ülegenoomse uuringu tulemusena selgus, et mittefunktsionaalse mitokondriga rakkudel on matjate kolooniate moodustumine defektne (Ryan jt, 2012). On teada, et *rho*-mutandid ei ekspresseeri *FLO11* (Aun jt, 2013), mis võib olla põhjus, miks defektse mtDNA-ga tüved struktureeritud matte ei moodusta.

Sellest tulenevalt olid käesoleva töö eesmärgid järgmised:

- Analüüsida, kas erinev *FLO11* ekspressioonitase taastab *rho*-mutantide matjate kolooniate moodustumise metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega samale tasemele
- Testida, kas erinevalt *FLO11* ekspresseerivad *rho*-mutandid on võimelised invasiivselt kasvama
- Analüüsida geneetilisi interaktsioone hüpermatte põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel
- Määrata hüpermatjaid kolooniaid põhjustavate deletsioonidega tüvede *FLO11* ekspressioonitasemed matja koloonia ääreala rakkudes

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud plasmiidid ja tüved

Töös kasutatud plasmiidid on toodud tabelis 1. Nendelt plasmiidelt paljundati erineva *FLO11* ekspressioonitasemega tüvede konstrueerimisel kasutatud integratsioonikassetid.

**Tabel 1.** Töös kasutatud plasmiidid.

Plasmiid	Seleksioonimarker	Allikas
p416-P <sub>TEF1-unmutated1</sub>	<i>LEU2</i>	Nevoigt jt, 2006
p416-P <sub>TEF1-mut3</sub>	<i>LEU2</i>	Nevoigt jt, 2006
p416-P <sub>TEF1-mut6</sub>	<i>LEU2</i>	Nevoigt jt, 2006
p416-P <sub>TEF1-mut9</sub>	<i>LEU2</i>	Nevoigt jt, 2006

Töös kasutati pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  ja BY4741 tüvesid.  $\Sigma 1278b$  metsiktüüpi ning selle baasil konstrueeritud tüved on toodud lisas 1. Kasutatud BY4741 tüved on toodud lisas 2.

### 2.2.2 Töös kasutatud söötmed ja kasvutingimused

Pagaripärmi rakke kasvatati 30 °C juures YPD söötmes (1% *Bacto* pärmiekstrakt, 2% *Bacto* pepton, 2% glükoos). YPD tardsöötmete tegemiseks lisati nimetatud söötme komponentidele 2% agarit. Transformantide selekteerimiseks lisati YPD tardsöötmetele 300 mg/l genetitsiini (G418) ja/või 100 mg/l nourseotritsiini (Nat). Seleksiooniks kasutati ka SC-Leu tardsöötmeid (0,67% pärmi lämmastikaluste segu, 0,2% aminohapete segu, millest puudub leutsiin, 2% glükoos, 2% agar).

Pagaripärmi libisevat kasvu analüüsiti 25 °C juures poolvedelatel YPD söötmetel, kuhu oli lisatud 0,3% agarit. 90 mm läbimõõduga tassidel kasutati 20 ml söödet ja 50 mm diameetriga tassidel 9,5 ml söödet.

### 2.2.3 Deletsioonitüvede konstrueerimine

Deletsioonikassettide paljundamiseks kasutati pagaripärmi BY4741 tüve baasil konstrueeritud deletsioonimutante (Euroscarf kollektsioon), millest uuritavate geenide deleteerimiseks oli kasutatud *kanMX6* kassetti (lisa 2).

Deletsioonimutantidest eraldati genoomne DNA LiOAc-SDS meetodi abil (Lööke jt, 2011). Eraldatud DNA-lt amplifitseeriti uuritav *kanMX6* kassett PCR-i abil. Selleks kasutati uuritavast avatud lugemisraamist (ingl k *open reading frame*, ORF) üles- ja allavoolu jäävaid praimereid. Vastavate praimerite järjestused on toodud lisas 3. Saadud PCR-i produktid puhastati kasutades GeneJet PCR Purification Kit'i (Fermentas) või GEL/PCR Purification Mini Kit'i (FavorPrep).

Paljundatud deletsioonikassett transformeeriti SC $\Sigma$ -48 (*rho*<sup>+</sup>), SC $\Sigma$ -139 (*Amip1*) ja SC $\Sigma$ -160 (*rho*<sup>-</sup>) tüvedesse, kasutades LiOAc meetodit (Knop jt, 1999). Rakke kasvatati üleöö YPD vedelsöötmes ning plaaditi seejärel YPD tardsöötmetele, kuhu oli transformantide seleksiooniks lisatud antibiootikume G418 (*rho*<sup>+</sup> ja *rho*<sup>-</sup> tüvede puhul) või G418 ja Nat (*Amip1* tüve puhul).

Saadud transformantidest eraldati genoomne DNA LiOAc-SDS meetodiga (Lööke jt, 2011). Deletsioonikassetti korrektset integreerumist kontrolliti PCR-i abil ning selleks kasutati

*kanMX6* kassetispetsiifilist praimerit *pYM\_check\_reverse* ja uuritava geeni spetsiifilist praimerit *check\_forward*. Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisas 3.

#### **2.2.4 Erineva *FLO11* ekspressioonitasemega tüvede konstrueerimine**

Erineva *FLO11* ekspressioonitasemega tüvede saamiseks integreeriti pagaripärmi genoomi ülesvoolu *FLO11* ORF-i modifitseeritud *TEF1* promootorite järjestused (Nevoigt jt, 2006).

Integratsioonikassettide paljundamiseks kasutati plasmide, mis on välja toodud tabelis 1. Integratsioonikassette amplifitseeriti PCR-i abil kasutades *FLO11\_up\_forward* ja *FLO11\_down\_reverse* praimereid (praimerite järjestused on toodud lisas 4). Saadud PCR-i produktid puhastati kasutades GEL/PCR Purification Mini Kit'i (FavorPrep).

Puhastatud DNA fragmendid transformeeriti SC $\Sigma$ -160 (*rho*<sup>-</sup>) tüve rakkudes kasutades LiOAc meetodit (Knop jt, 1999). Transformatsioonisegu plaaditi selektsiooniks SC-Leu tardsöötmetele.

Saadud transformantide genoomne DNA eraldati LiOAc-SDS meetodiga (Lööke jt, 2011). *TEF1* promootorite korrektset integreerumist kontrolliti PCR-i abil ning selleks kasutati *FLO11\_forward* ja *LEU2\_contl\_reverse* praimereid (lisa 4).

#### **2.2.5 Libiseva kasvu analüüs**

Pagaripärmi libiseva kasvu analüüsiks kasutati Reynolds'i ja Fink'i poolt välja töötatud meetodit (Reynolds ja Fink, 2001). Pagaripärmi üksik koloonia külvati poolvedela (0,3% agarit) YPD tassi keskele. Tassid suleti parafilmiga, et ära hoida nende liigset kuivamist. Igast tüvest külvati viis paralleeli. Tasse inkubeeriti viis päeva 25 °C juures. Iga tüvega korraldati katsed vähemalt kaks korda. Libiseva kasvu analüüsil kasutatud tüved on toodud tabelis 2.

Viiendal päeval pildistati moodustunud matjaid struktuure. Pildistamiseks kasutati Nikon D60 (10,2 MP) kaamerat ning objektiivi AF-S DX NIKKOR 18-55 mm. Fotode töötlemiseks kasutati programmi PhotoFiltre 7.

CellProfiler 2.0 programmi abil arvutati kolooniate pindalade suhe (Lamprecht jt., 2007). Programmi abil kvantifitseeritakse uuritava koloonia erinevus metsiktüüpi koloonia suhtes, kasutades selleks matja koloonia pikslite arvu fotol.

Matja koloonia moodustamise efektiivsus arvutati järgmise valemiga (Ryan jt, 2012 järgi):

$$\left( \left( \frac{\text{uuritava koloonia pikslite arv}}{\text{metsiktüüpi koloonia pikslite arv}} \right) - 1 \right) \times 100\%$$

Iga tüve kolooniate pindalade suhe arvutati vähemalt kümne matja koloonia kohta.

### 2.2.6 Invasiivse kasvu analüüs

Pagaripärmi invasiivset kasvu testiti erineva *FLO11* ekspressioonitasemega *rho*-mutantides.

Invasiivse kasvu analüüsiks külvati uuritavad tüved YPD tardsöötmele ning inkubeeriti 30 °C juures viis päeva. Tasse pildistati. Seejärel pesti tasse korduvalt H<sub>2</sub>O-ga. Tassid kuivatati ning pildistati uuesti. Kontrollina analüüsiti ka *rho*<sup>+</sup> tüve, mida inkubeeriti 30 °C juures kolm päeva.

### 2.2.7 Totaalse RNA eraldamine ja cDNA süntees

Totaalse RNA eraldamiseks kasutati pagaripärmi matja struktuuri ääreala (*rim*) rakke. Rakud koguti tassidelt spaatliga, pesti 1 ml jääkülma H<sub>2</sub>O-ga, tsentrifuugiti 1 min lauatsentrifuugis (Eppendorf minispin, rootor F-45-12-11) ning külmutati vedelas N<sub>2</sub>-s. Rakke säilitati -80 °C juures.

RNA eraldati ka vedelsöötmes kasvanud rakkudest. Selleks külvati üksik koloonia YPD vedelsöötmesse ning rakke kasvatati eksponentsiaalse kasvufaasini. Kasutati 10-15 OD<sub>600</sub> ühikut rakke. Rakud tsentrifuugiti 4 °C juures 3200 rpm („Hettlich“ Universal 32R tsentrifuug, rootor 1617). Seejärel pesti rakke 1 ml külma RNA puhvriga (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA). Rakud külmutati vedelas N<sub>2</sub>-s ning säilitati -80 °C juures.

RNA eraldamiseks lisati rakkudele 100 µl jääkülma RNA puhvrit ja ½ mahus klaaskuule ning segati vortexil 3 min 4 °C juures. Seejärel lisati 450 µl RNA puhver-SDS'i (RNA puhver, 1,3% SDS) ja 450 µl happelist fenooli (pH 5,5). Segati taas vortexil 3 min 4 °C juures. Segu tsentrifuugiti 10 min 13000 rpm 4 °C juures. Seejärel teostati kaks korda fenool/kloroform töötlus. Järgnevalt lisati RNA lahusele 20 µl 4 M NaCl ja 1 ml 96% etanooli. RNA-d sadestati -80 °C juures üleöö.

Üleöö sadenenud RNA-d tsentrifuugiti 10 min 13000 rpm 4 °C juures. Sadet pesti 70% etanooliga, kuivatati ning lahustati 50 µl H<sub>2</sub>O-s. RNA kontsentratsioonid mõõdeti NanoDrop

masinaga (Thermo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer). RNA-d säilitati -80 °C juures.

Järgnevalt teostati RNA-dele DNaseI töötlus ning selleks kasutati 5 µg RNA-d. Reaktsioon teostati mahus 40 µl, milles sisaldus 4 U RNase-vaba DNaseI (Thermo Scientific). Reaktsioonisegusse lisati ka 32 U RNase inhibiitorit (*RiboLock RI*, Thermo Scientific). DNaseI töötluste reaktsioon viidi läbi 1x DNaseI reaktsioonipuhvris, mis sisaldas MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific). Reaktsioonisegu inkubeeriti 30 min 37 °C juures, seejärel lisati 4 µl 25 mM EDTA-d ja inkubeeriti 10 min 65 °C juures. Järgnevalt lisati 110 µl H<sub>2</sub>O ja 15 µl 3 M NaOAc. Teostati fenool/kloroform töötlus. DNaseI töödeldud RNA-le lisati 375 µl 96% etanooli ning sadestati -80 °C juures üleöö.

Sadenenud RNA-d tsentrifuugiti 15 min 13000 rpm 4 °C juures. Sadet pesti 70% etanooliga, kuivatati ning lahustati H<sub>2</sub>O-s. RNA-d säilitati -80 °C juures.

cDNA sünteesiks kasutati 1,5 µg RNA-d, millele lisati kolme *reverse* praimerisegu (igat praimerit reaktsioonisegus 20 pmol/µl). Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisas 5. RNA denatureerimiseks inkubeeriti RNA-d koos praimeritega 5 min 65 °C juures. cDNA süntees teostati spetsiaalses puhvris (*reaction buffer for RT*, Thermo Scientific), millele lisati 1 mM dNTP, 15 U revertaasi (*RevertAid RT*, Thermo Scientific) ja eelnevalt denatureeritud RNA-d koos praimeritega. Reaktsioonisegu inkubeeriti 60 min 42 °C juures ning reaktsioon lõpetati inkubeerides proove 10 min 70 °C juures. Proove säilitati -20 °C juures.

### 2.2.8 qRT-PCR

Kvantitatiivne pöördtranskriptaasi PCR (qRT-PCR) teostati cDNA-dega, mida lahjendati 80 korda H<sub>2</sub>O-ga. Reaktsioon teostati mahus 10 µl, mis sisaldas 4 µl cDNA-d, 5 µl qPCR *master mix*-i (Thermo Scientific) ning *reverse* ja *forward* praimerit (mõlema praimeril lõppkontsentratsioon 1 pmol/µl). Kasutati kolme erinevat praimerite paari. Kasutatud praimerite järjestused on toodud lisas 5.

cDNA-d, DNaseI töötluste kontrollid ning H<sub>2</sub>O pipeteeriti 384 kaevuga plaadile (*384 well plate, ABI compatible type*, Bioplastics BV). Kõiki proove analüüsiti kolme paralleelina. PCR-i reaktsioon viidi läbi kasutades ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat.

Reaktsiooni läbi viimiseks kasutati järgnevat programmi: reaktsioonisegu denatureeriti 95 °C 15 min, seejärel toimus amplifikatsioon 40 tsüklit 95 °C 15 sek ja 60 °C 1 min.

Tulemuste analüüsiks kasutati võrdleva  $C_T$  meetodit (Schmittgen ja Livak, 2008) ning *FLO11* ekspressioonitase normaliseeriti *UBC6* ja *ARP6* ekspressioonitasemete vastu. Kõik arvutused teostati MS Excel 2013 programmiga.



## 2.3 Tulemused

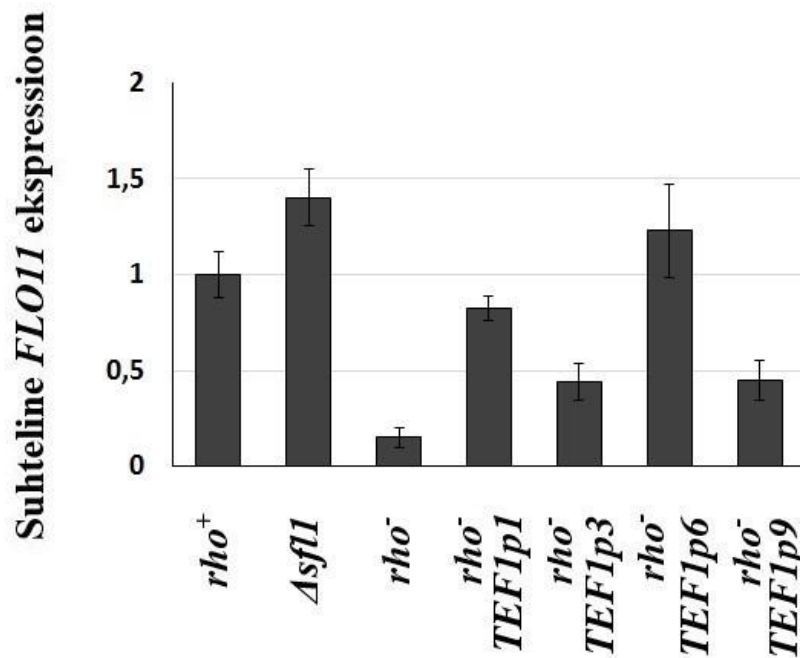
### 2.3.1 *FLO11* ekspressioonitase *rho*-mutantides *FLO11* promootori asendamisel erinevate *TEF1* promootori variantidega

*Rho*-mutantidel on ligikaudu neli korda madalam *FLO11* ekspressioonitase kui *rho*<sup>+</sup> rakkudel (Aun jt, 2013). *FLO11* ekspressioonitasemete muutmiseks *rho*<sup>-</sup> rakkudes konstrueeriti tüved, millel *FLO11* promootor asendati erinevate *TEF1* promootori variantidega. Kasutati nelja erinevat *TEF1* promootori varianti – algupärast *TEF1* promootorit (edaspidi tähistatud kui *TEF1p1*) ning kolme eri tugevusega promootori varianti (edaspidi tähistatud ka kui *TEF1p3*, *TEF1p6* ja *TEF1p9*) (Nevoigt jt, 2006).

Konstrueeritud *rho*-mutantides analüüsiti *FLO11* ekspressiooni qRT-PCR meetodi abil. *FLO11* ekspressioon normaliseeriti *ARP6* ja *UBC6* ekspressioonitasemete vastu. Kontrollina valiti *TEF1* promootori variatsioonidele kõrvale nii *rho*<sup>-</sup> kui ka  $\Delta$ *sfl1* tüve rakud.  $\Delta$ *sfl1* puhul on teada, et *FLO11* ekspressioon on tugevam kui *rho*<sup>+</sup> rakkudes. Analüüsiks kasutati eksponentsiaalses kasvufaasis olevaid rakke. *Rho*<sup>+</sup> *FLO11* ekspressioonitase arvestati väärtuseks 1 ning teiste uuritavate tüvede ekspressioonitasemed arvutati *rho*<sup>+</sup> tüve suhtes.

Saadi kinnitust, et *rho*<sup>-</sup> rakkudel on tõepoolest madalam *FLO11* ekspressioonitase kui *rho*<sup>+</sup> rakkudel – ekspressioon vähenes 6,7 korda (joonis 5). Kinnitust leidis ka see, et  $\Delta$ *sfl1* rakkudes on *FLO11* tase kõrgem, ekspressioonitase suurenes 1,4 korda võrreldes metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega (joonis 5).

*FLO11* ekspressioonitasemed varieerusid erinevate *TEF1* promootori variantidega *rho*<sup>-</sup> rakkudel (joonis 5). Võrreldes metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega suurenes *rho*<sup>-</sup> *TEF1p6* puhul *FLO11* ekspressioon 1,2 korda. *TEF1p1* puhul oli võrreldes *rho*<sup>+</sup> rakkudega 1,2 korda madalam *FLO11* ekspressioonitase. *TEF1* promootori variandid 3 ja 9 andsid sarnased tulemused – *FLO11* ekspressioon vähenes 2,2 korda võrreldes *rho*<sup>+</sup> rakkudega. Võrreldes *rho*<sup>-</sup> rakkudega oli kõikidel erinevate *TEF1* promootori variantidega *rho*<sup>-</sup> rakkudel kõrgem *FLO11* ekspressioonitase (joonis 5).



**Joonis 5.** *FLO11* ekspressioon eksponentsiaalses kasvufaasis olevates  $\rho^-$  rakkudes, milles *FLO11* promootor on asendatud erinevate *TEF1* promootori variantidega. Kontrolliks kasutati  $\rho^+$  ja  $\Delta sfl1$  rakke.  $\rho^+$  rakkude *FLO11* ekspressioonitase on arvestatud väärtuseks 1 ning teiste tüvede ekspressioonitasemed on arvutatud selle suhtes. Joonisel on esitatud igast tüvest vähemalt kolme paralleeli keskmistatud tulemused koos standardvigadega. *TEF1p1*, 3, 6 ja 9 tähistavad vastavaid promootori variante.

### 2.3.2 Erineva *FLO11* ekspressioonitaseme mõju $\rho^-$ -mutantide invasiivsele kasvule

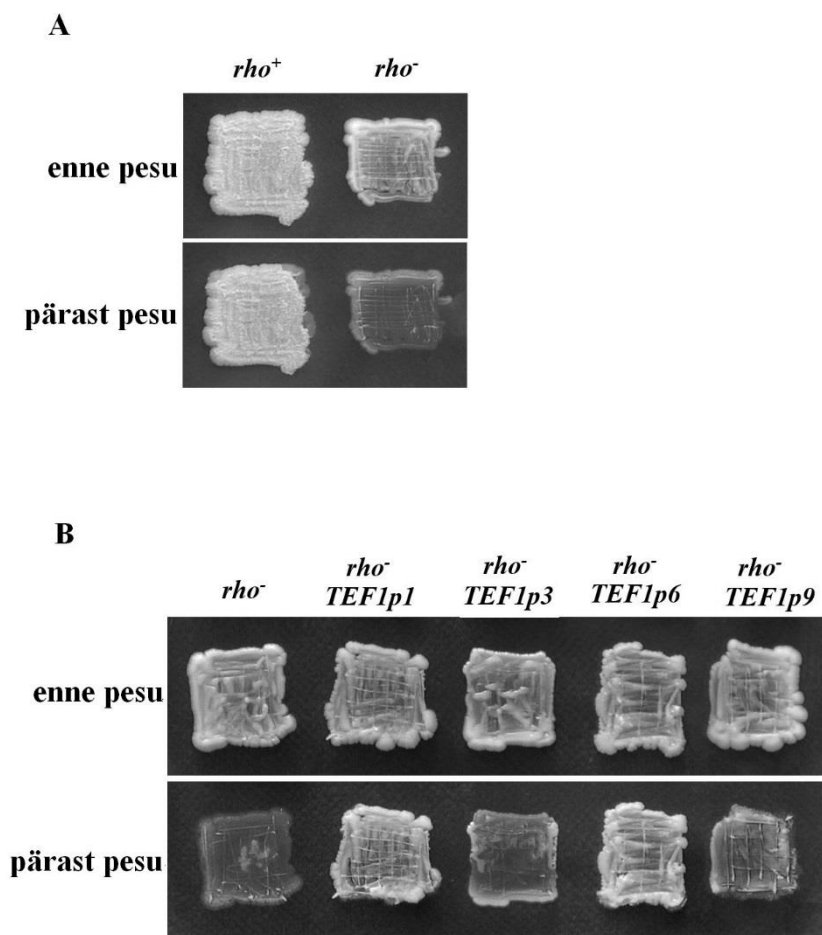
Eelnevast katsest selgus, et *FLO11* promootori vahetus *TEF1* promootori variantide vastu muutis *FLO11* ekspressioonitaset  $\rho^-$  rakkudes (joonis 5). Eelnevalt on teada, et pagaripärmi invasiivne kasv on tugevalt sõltuv *FLO11* ekspressioonist (Guo jt, 2000). Samas on teada ka see, et  $\rho^-$ -mutandid ei ekspresseeri *FLO11*, mistõttu nende invasioon agarisse on defektne (Aun jt, 2013).

Järgnevalt testiti saadud tüvedel invasiivset kasvu, et teada saada, kas *FLO11* ekspressioonitase korreleerub nende tüvede invasioonivõimega.  $\rho^-$  tüved külvati YPD tardsöötmetele ja inkubeeriti viis päeva 30 °C juures, kontrolliks külvati ka metsiktüüpi  $\rho^+$  tüvi, mida inkubeeriti kolm päeva 30 °C juures.

$\rho^+$  rakkude invasiivne kasv on tugev. Rakkude pesemisel veega jääb enamik rakke söötme pinnale alles (joonis 6A).  $\rho^-$  rakud on defektsed invasiivse kasvu osas, sest enamik rakke

tulevad veega pestes YPD tardsöötmetl maha. Söötmesse on kasvanud vaid väike kiht koloonia alumistest rakkudest, mis näitab invasiooni defekti (joonised 6A ja B).

Selgus, et erinevalt *FLO11* ekspresseerivad *rho*-mutandid on erineva invasioonivõimega (joonis 6B). Kõige tugevam invasioon oli *TEF1p6* promootoriga rakkudel. Tugev invasioon esines ka *TEF1p1* promootoriga rakkude puhul. Nõrgem invasiivne kasv oli *TEF1* promootori variantide 3 ja 9 rakkudel, mis olid invasiooni poolest *rho*<sup>+</sup> rakkudest tunduvalt halvemad, ent võrreldes *rho*<sup>-</sup> rakkudega oli invasioonivõime veidi paranenud. Seega korreleerus *rho*<sup>-</sup> rakkude erinev *FLO11* ekspressioonitase (joonis 5) nende invasioonivõimega (joonis 6B).



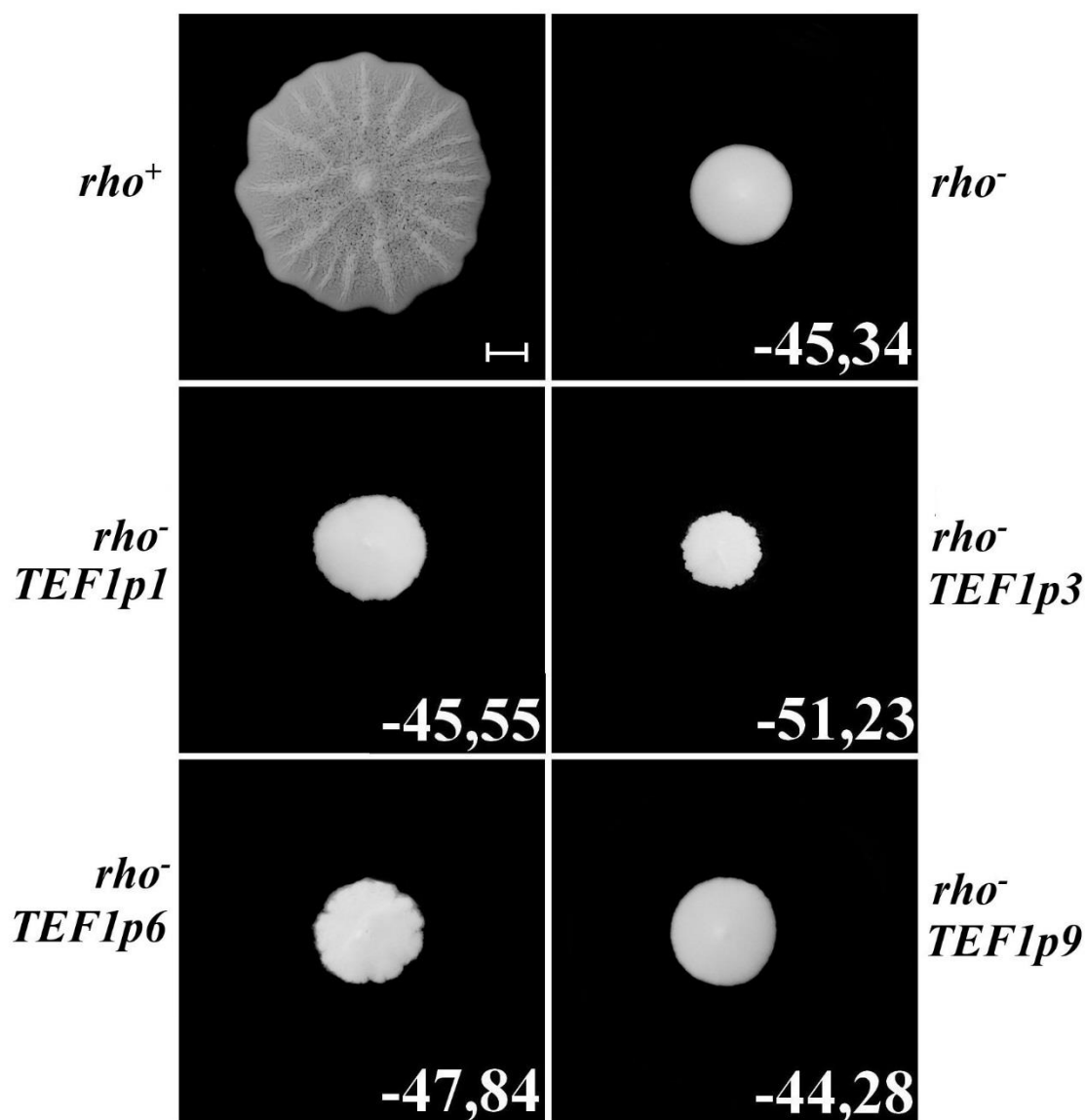
**Joonis 6.** Erineva *FLO11* ekspressioonitaseme mõju *rho*<sup>-</sup> rakkude invasiivsele kasvule. Joonisel on toodud YPD tardsöötmetl viis päeva (*rho*-mutandid) või kolm päeva (*rho*<sup>+</sup>) 30 °C juures kasvanud rakud enne ja pärast veega pesu. A – *rho*<sup>+</sup> ja *rho*<sup>-</sup> invasiivse kasvu võrdlus, B – erineva *FLO11* ekspressioonitasemega *rho*<sup>-</sup> rakkude invasiivne kasv. *TEF1p1*, 3, 6 ja 9 tähistavad promootori variante.

### 2.3.3 Erineva *FLO11* ekspressioonitaseme mõju *rho*-mutantide rakkude matjate struktuuride moodustumisele

Eelnevalt on näidatud, et pagaripärmi matjate struktuuride tekkeks on vajalik *FLO11* ekspresseerumine (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012). Kui *FLO11* deleteerida, on mattide moodustamine defektne. Defektse mtDNA-ga rakud moodustavad metsiktüüpi rakkudest kordades väiksemaid matte, milles lisaks ei eristu erinevad struktuurid (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013). On teada, et *rho*-mutandid ei ekspresseeri *FLO11* (Aun jt, 2013), mis võiks olla põhjuseks, miks nende poolt moodustatavad matjad kolooniad on väikesed ja struktuuritud.

Käesolevas töös testiti erineva *FLO11* ekspressioonitaseme mõju matjate struktuuride moodustumisele *rho*<sup>-</sup> rakkudes. Analüüsiti nelja erineva *TEF1* promootori variatsiooniga rakke (*TEF1p1*, *TEF1p3*, *TEF1p6*, *TEF1p9*), mille puhul arvutati matja koloonia moodustamise skoorid. Skoorid arvutati viis päeva 25 °C juures pooltahkel YPD söötmel kasvanud kolooniate puhul.

Selgus, et kõik analüüsitud *rho*<sup>-</sup> rakud moodustasid endiselt väikeseid ja struktuurilt siledaid matjaid kolooniaid. Erinevus oli koloonia ääreala rakkudel – erineva *FLO11* ekspressioonitasemega *rho*<sup>-</sup> rakkudel olid matjate kolooniate ääred rohkem või vähem sakilised. *TEF1p9* puhul olid matid äärtest väga vähe sakilised. Nimetatud mutantide matja koloonia moodustamise skoorid jäid vahemikku -51,23 kuni -44,28, sealjuures *rho*<sup>-</sup> tüve enda matja koloonia moodustamise skoor oli -45,34 (joonis 7). Mitte ükski analüüsitud erineva *FLO11* ekspressioonitasemega *rho*-mutant ei taastanud matja koloonia moodustamise võimet *rho*<sup>+</sup> tüvega samale tasemele.



**Joonis 7.** Erineva *FLO11* ekspressioonitaseme mõju pagaripärmi  $\rho^-$  rakkude matjate kolooniate moodustumisele. Kõiki tüvesid inkubeeriti viis päeva 25 °C juures pooltahkel YPD söötmel ning arvutati matja koloonia moodustamise skoorid. Skoorid arvutati metsiktüüpi  $\rho^+$  matja koloonia suhtes. Iga tüve puhul välja toodud skoor on vähemalt 10 korduse keskmistatud tulemus. *TEF1p1*, 3, 6 ja 9 tähistavad erinevaid promootori variante. Mõõtjoon – 5 mm.

### 2.3.4 *FLO11* ekspressioon erinevate *TEF1* promootori variantidega $\rho^-$ -mutantide matjate kolooniate rakkudes

Eelnevatest katsetest selgus, et erinev *FLO11* ekspressioonitase ei taastanud  $\rho^-$ -mutantide matjate kolooniate moodustumise võimet. Seetõttu analüüsiti järgnevalt nende  $\rho^-$ -mutantide

*FLO11* ekspressiooni qRT-PCR meetodi abil. Ekspressioonitasemeid analüüsiti erinevate *TEF1* promootori variantidega  $\rho^-$  rakkudel. Rakud koguti matjate kolooniate äärealast.

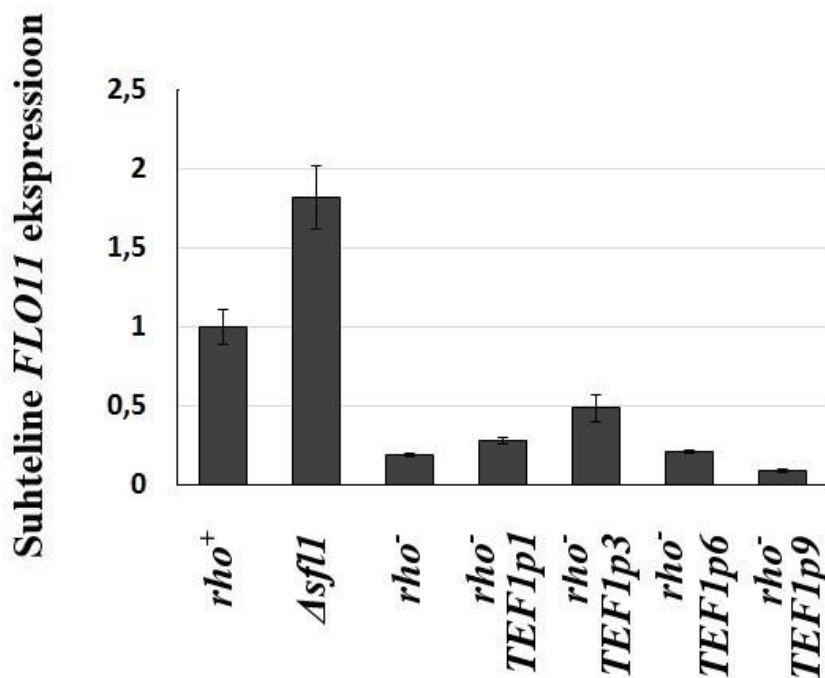
Kontrollina analüüsiti nii  $\rho^-$  kui ka  *$\Delta sfl1$*  tüve rakke. *FLO11* ekspressioon normaliseeriti *ARP6* ja *UBC6* ekspressioonitasemete vastu. Metsiktüüpi  $\rho^+$  *FLO11* ekspressioonitase arvestati väärtuseks 1 ning teiste uuritavate ekspressioonitasemed arvutati  $\rho^+$  tüve suhtes.

Leiti, et  $\rho^-$  rakud, mis olid kogutud matjatest kolooniatest, ekspresseerivad madalamal tasemel *FLO11* kui  $\rho^+$  rakud.  $\rho^-$  rakkude *FLO11* tase oli 5,2 korda madalam võrreldes  $\rho^+$  rakkudega (joonis 8).  *$\Delta sfl1$*  rakkude *FLO11* ekspressioonitase oli kõrgem kui  $\rho^+$  rakkudel, täpsemalt oli see 1,8 korda kõrgem (joonis 8).

*FLO11* ekspressioonitase vähenes kõikide  $\rho^-$  *TEF1* promootorite variantide puhul võrreldes  $\rho^+$  rakkudega (joonis 8).  $\rho^-$  *TEF1p1* puhul oli võrreldes  $\rho^+$  rakkudega 3,5 korda madalam *FLO11* ekspressioonitase. *TEF1p3* puhul oli *FLO11* ekspressioon  $\rho^+$  rakkudest 2,1 korda madalam. *TEF1* promootori variant 6 vähendas *FLO11* ekspressiooni 4,7 korda võrreldes  $\rho^+$  rakkudega. *TEF1p9* puhul oli *FLO11* ekspressioonitase langus kõige enam märgatav. Võrreldes  $\rho^+$  rakkudega vähenes see lausa 11,1 korda.

Võrreldes  $\rho^-$  rakkudega suurenes *FLO11* ekspressioon kõikidel uuritud *TEF1* promootori variantidega, välja arvatud *TEF1p9* puhul (joonis 8). *TEF1p9* puhul oli *FLO11* ekspressioonitase võrreldes  $\rho^-$  rakkudega 2,1 korda madalam.  $\rho^-$  *TEF1p1* puhul oli *FLO11* tase 1,5 korda kõrgem. *TEF1p3* puhul oli *FLO11* ekspressioon 2,5 korda kõrgem kui  $\rho^-$  rakkudel. *TEF1* promootori variant 6 suurendas *FLO11* ekspressioonitaset 1,1 korda võrreldes  $\rho^-$  rakkudega.

Mitte ükski *TEF1* promootori variatsiooni asendus *FLO11* promootoriga ei suurendanud  $\rho^-$  rakkudes *FLO11* ekspressioonitaset metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudega samale tasemele, kui rakud pärinesid matjatest kolooniatest. Võrreldes eksponentsiaalses kasvufaasis olevate rakkudega (joonis 5) olid *FLO11* ekspressioonitasemed matjatest kolooniatest kogutud rakkudes tunduvalt madalamad (joonis 8).



**Joonis 8.** *FLO11* ekspressioon erinevate *TEF1* promootori variantidega *rho*<sup>-</sup> matjatest kolooniatest kogutud rakkudes. Kontrolliks kasutati *rho*<sup>+</sup> ning *Asf1* rakke. *Rho*<sup>+</sup> rakkude *FLO11* ekspressioonitase on arvestatud väärtuseks 1 ning teiste tüvede ekspressioonitasemed arvutatud selle suhtes. Joonisel on esitatud igast tüvest vähemalt kolme paralleeli keskmistatud tulemused koos standardvigadega. *TEF1p1*, 3, 6 ja 9 tähistavad vastavaid promootori variante.

### 2.3.5 Geneetilised interaktsioonid hüpermatjate kolooniate teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel

2012. aastal avaldatud ülegenoomses töös näidati, millised geenid on vajalikud matjate kolooniate moodustumiseks (Ryan jt, 2012). Tekkinud matjaid kolooniaid võrreldi metsiktüüpi matjate kolooniatega, millest lähtuvalt arvutati kolooniate pindalade suhted. Saadud pindalade suhetest lähtuvalt kirjeldati hüpo- ja hüpermatjad kolooniad. Hüpomatjaks loeti need kolooniad, mille pindalade suhted olid  $\leq -26$  ning hüpermatjaks need, mille puhul oli suhe  $\geq 26$ . Uuringu tulemusena selgus, et 33 geeni deleteerimisel tekivad hüpermatid ning 655 deletsiooni puhul hüpomatid.

Käesolevas töös analüüsiti hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide fenotüüpe ning geneetilisi interaktsioone *rho*-mutantidega. 33-st hüpermatti põhjustavast deletsioonist analüüsiti 27 deletsioonimutanti (tabel 2).

**Tabel 2. Hüpermatjate kolooniate teket põhjustavad käesolevas töös analüüsitud 27 geeni (andmed [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org) järgi)**

<b>Geen</b>	<b>Geeni poolt kodeeritava valgu funktsioon</b>
<i>APM4</i>	AP-2 subühik, mis on vajalik AP-2 lokaliseerimiseks
<i>DEP1</i>	Rpd3L histoonide deasetüleerimise kompleksi komponent, mis osaleb struktuursete fosfolipiidide biosünteesi geenide regulatsioonis; telomeeride, paardumise spetsiifika, sporulatsioonivõime säilitamisel
<i>GYP8</i>	GTP-aasi aktiveeriv valk, mis osaleb vesikulaarse transpordi regulatsioonis
<i>IDP3</i>	NADP-sõltuv isotsitraadi dehüdrogenaas, mis katalüüsib isotsitraadi oksüdatsiooni $\alpha$ -ketoglutaradiiks
<i>LDB17</i>	Osaleb endotsütoosi regulatsioonis
<i>MDM31</i>	Mitokondri sisemembraani valk, mis osaleb fosfolipiidide metabolismis
<i>MID1</i>	Plasmamembraani ja endoplasmaatilise retiikulumi N-glükosüleeritud integraalne valk, mis käitub kui $Ca^{2+}$ ionide kanal
<i>MKT1</i>	Moodustab kompleksi Pbp1-ga, mis vahendab <i>HO</i> posttranslatsioonilist regulatsiooni
<i>NFU1</i>	Osaleb mitokondrites raua metabolismis
<i>OCA1</i>	Oletatav türosiinfosfataas, mis on vajalik rakutsükli arestiks vastusena DNA oksüdatiivsele kahjustusele
<i>OCA2</i>	Teadmata funktsiooniga valk, mis on vajalik rakutsükli arestiks
<i>OCA4</i>	Tsütoplasmaatiline valk, mis on vajalik rakutsükli arestiks
<i>PAA1</i>	Polüamiinatsetüültransferaas, mis atsetüleerib polüamiine ja aralküülamiine, võimalik funktsioon ka transkriptsioonis ja DNA replikatsioonis
<i>PDA1</i>	Püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi E1 $\alpha$ -subühik, mis katalüüsib püruvaadi oksüdatiivset dekarboksüleerimist AcCoA-ks
<i>PDX1</i>	Mitokondri püruvaadi dehüdrogenaasi kompleksi valk, mis on vajalik E2-E3 kompleksi moodustumisel
<i>PEX18</i>	Peroksiin, mis on vajalik valkude suunamisel peroksisoomi maatriksisse
<i>RSM28</i>	Mitokondriaalne ribosomaalne valk, mille võimalik funktsioon on osalemine translatsiooni initsiatsioonis
<i>SCY1</i>	Oletatav kinaas, mille võimalik roll on osaleda rakusiseste steroidide transpordil
<i>SLF1</i>	RNA-d siduv valk, mis assotsieerub polüsoomidega, võimalik funktsioon on ka osalemine mRNA translatsiooni regulatsioonis
<i>SSA4</i>	Kuumašoki valk, mis paikneb tsütoplasmas ja osaleb tuumade kontsentreerimisel stressitingimustel
<i>TMA22</i>	Teadmata funktsiooniga valk, mis assotsieerub ribosoomidega
<i>TRE1</i>	Transferriini retseptori sarnane valk, mis reguleerib metallide transporterit Smf1 ubikvitiinüleerimist ja vakuolaarset degradeerimist
<i>VPS13</i>	Prospoori membraani morfogeneesi valk, mis osaleb prospoori moodustumisel, sporulatsioonis, vakuolaarsete valkude sorteerimisel
<i>YDR444W</i>	Teadmata funktsiooniga valk, võimalik hüdrolaas, mis on vajalik estersidemete moodustumisel
<i>YHR045W</i>	Teadmata funktsiooniga valk, võimalik roll raua ja/või aminohapete metabolismis
<i>YMR158C-A</i>	Teadmata funktsiooniga valk, mis võib omada lipiidide seostumissaiti
<i>YPR027C</i>	Teadmata funktsiooniga valk



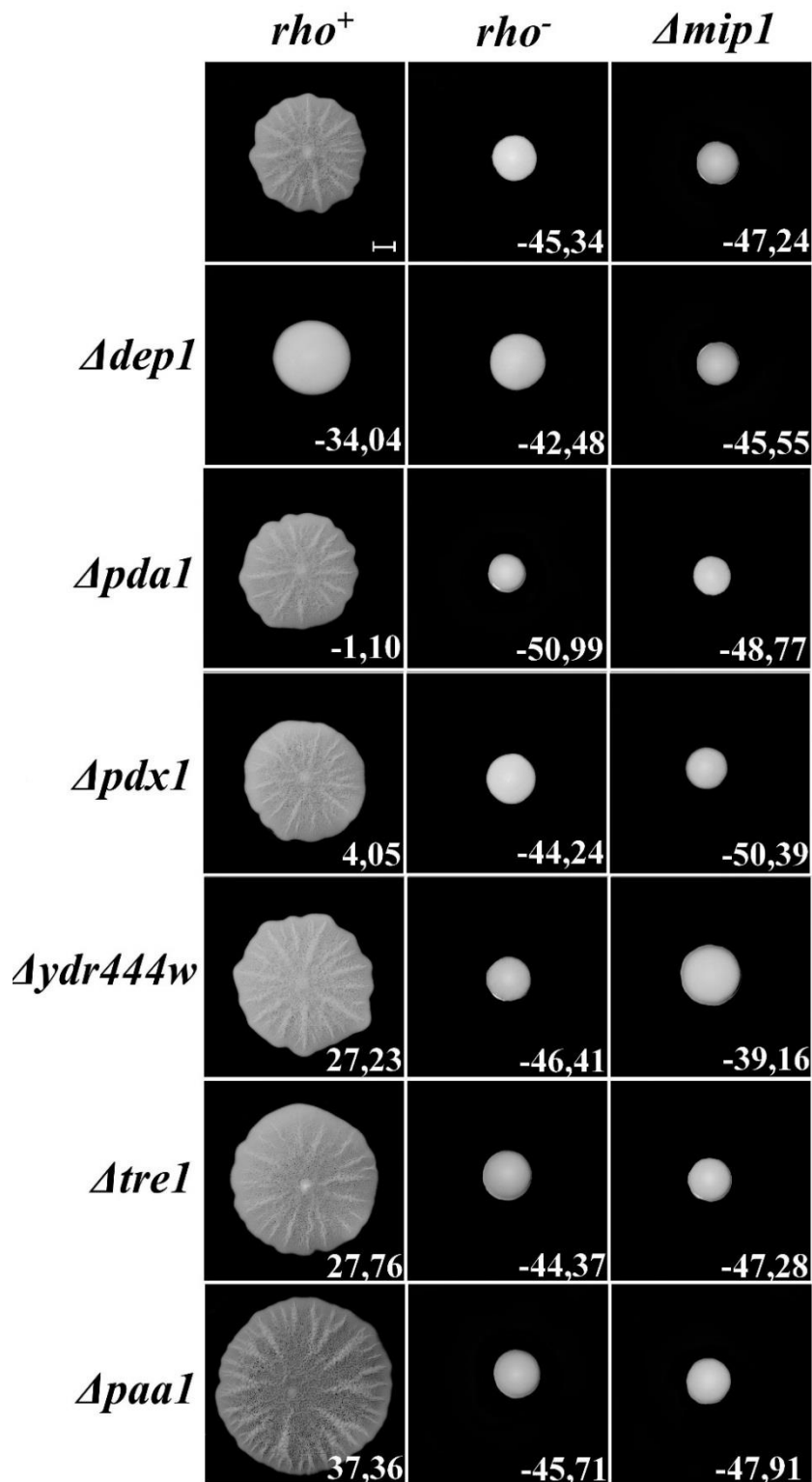
33-st deletsioonimutandist kuus (*Δgpa2*, *Δmsc7*, *Δram1*, *Δshr5*, *Δsip4*, *Δssk2*; tabel 3) olid meie laboris juba varem analüüsitud ning nende puhul geneetilisi interaktsioone ei tuvastatud (Kruuse, 2013).

**Tabel 3. Hüpermatjate kolooniate teket põhjustavad varasemalt analüüsitud 6 geeni (andmed [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org) järgi)**

Geen	Geeni poolt kodeeritava valgu funktsioon
<i>GPA2</i>	Heterotrimeerse G-valgu $\alpha$ -subühik, mis vastutab cAMP-PKA rajas glükoosi ära tundmise eest
<i>MSC7</i>	Teadmata funktsiooniga valk
<i>RAM1</i>	CAAX farnesüültransferaasi $\beta$ -subühik, mis on vajalik selleks, et Ras-valgud ja a-faktor lokaliseeruksid membraanis
<i>SHR5</i>	Palmitüültransferaasi subühik, mis lisab Ras-valkudele palmitüülhappejäägi, et need lokaliseeruksid membraanis
<i>SIP4</i>	C6 tsink klasteri transkriptsiooniline aktivaator, mis osaleb positiivse regulaatorina glükoneogeneesis
<i>SSK2</i>	<i>HOG1</i> MAPK raja kinaas, mis aktiveerub osmootse stressi korral

Käesolevas töös analüüsiti, kas hüpermatte põhjustavad deletsioonid võiksid mõjutada *rho*-mutantide matja koloonia moodustumise võimet. Lisaks uuriti *rho*<sup>+</sup> deletsioonimutantide mati moodustumist. Selleks asendati *rho*<sup>+</sup>, *rho*<sup>-</sup> ja *rho*<sup>0</sup> (*Δmip1*) rakkudes uuritavate 27 geeni ORF-id *kanMX6* kasseti vastu ning saadud mutantidel testiti matjate kolooniate moodustumise võimet, kasvatades tüvesid eelnevalt viis päeva pooltahkel YPD söötmel 25 °C juures.

Selgus, et geneetilisi interaktsioone deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel ei esine (joonis 9, tabel 4, lisa 6). Joonisel 9 on toodud näitena erinevate skooridega matjad kolooniad. Mitte ükski deletsioon ei taastanud *rho*-mutantide matja koloonia moodustumist metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega samale tasemele. Kõikide uuritud deletsioonide puhul tekkisid vaid hüpomatid, mis olid struktuurilt siledad. *Rho*<sup>-</sup> rakkude deletsioonimutantide puhul jäid matja koloonia moodustumise skoorid vahemikku -50,99 (*rho*<sup>-</sup> *Δpda1*) kuni -42,48 (*rho*<sup>-</sup> *Δdep1*), sealjuures *rho*<sup>-</sup> rakkude enda mati moodustamise skoor oli -45,34 (joonis 9, tabel 4, lisa 6). *Rho*<sup>0</sup> (*Δmip1*) rakkude deletsioonimutantide puhul jäid skoorid vahemikku -50,39 (*Δmip1* *Δpdx1*) kuni -39,16 (*Δmip1* *Δydr444w*). Sealjuures *Δmip1* enda mati moodustamise skoor oli -47,24 (joonis 9, tabel 4, lisa 6). *Rho*-mutantide puhul eristus teistest enim *Δmip1* *Δydr444w* (lisa 6), mille skoor oli võrreldes teistega suurem (-39,16), kuid samas jäi skoor ikka sellisesse vahemikku, et seda tuleb lugeda hüpomatjaks.



**Joonis 9.** Geneetiliste interaktsioonide analüüs hüpermattide teket põhjustavate deletsioonide ja *rho*-mutantide vahel. Joonisel on näidatud viis päeva 25 °C juures poolvedelal YPD söötmel kasvanud matjad kolooniad. Näidatud on vastavad *rho*<sup>+</sup>, *rho*<sup>-</sup> ja *Δmip1* deletsioonimutandid, millel on arvatud matjate kolooniate moodustumise skoor. Uuritavate tüvede skoorid on arvatud metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> tüve suhtes. Joonisel kujutatud skoorid on vähemalt kümne paralleeli keskmistatud tulemus. Mõõtjoon – 10 mm.

**Tabel 4. Geneetiliste ineraktsioonide analüüsil saadud matjate kolooniate skoorid.** Rohelisega on tähistatud geenid, mille deleteerimisel  $\rho^+$  rakkudes moodustus hüpomatt; sinisega geenid, mille deleteerimisel ei tekkinud hüper- ega hüpomatjat struktuuri; mustaga geenid, mille deleteerimisel moodustusid hüpermatid.

Deleteeritud geen	Tüvi ja matja koloonia moodustamise skoor		
	$\rho^+$	$\rho^-$	$\Delta mip1$
		-45,34	-47,24
<i>DEP1</i>	-34,04	-42,48	-45,55
<i>MDM31</i>	-8,46	-49,52	-44,78
<i>PDA1</i>	-1,10	-50,99	-48,77
<i>NFU1</i>	1,72	-47,59	-44,48
<i>RSM28</i>	4,02	-45,81	-48,06
<i>PDX1</i>	4,05	-44,24	-50,39
<i>YPR027C</i>	6,04	-46,25	-49,25
<i>LDB17</i>	7,21	-50,15	-47,68
<i>SSA4</i>	9,08	-42,61	-45,86
<i>PEX18</i>	11,59	-44,32	-44,52
<i>OCA4</i>	14,41	-48,34	-45,92
<i>TMA22</i>	17,91	-48,84	-45,27
<i>APM4</i>	26,01	-44,31	-44,75
<i>OCA2</i>	26,10	-45,14	-44,59
<i>YMR158C-A</i>	26,12	-50,31	-44,13
<i>YHR045W</i>	28,48	-49,22	-45,83
<i>YDR444W</i>	27,23	-46,41	-39,16
<i>GYP8</i>	27,70	-43,83	-47,61
<i>IDP3</i>	27,75	-48,22	-44,88
<i>TRE1</i>	27,76	-44,37	-47,28
<i>MID1</i>	27,87	-44,22	-44,09
<i>SCY1</i>	28,63	-44,79	-45,91
<i>SLF1</i>	29,02	-45,65	-44,95
<i>OCA1</i>	30,45	-49,33	-45,31
<i>MKT1</i>	31,61	-47,40	-44,32
<i>VPS13</i>	33,21	-42,89	-46,60
<i>PAA1</i>	37,36	-45,71	-47,91

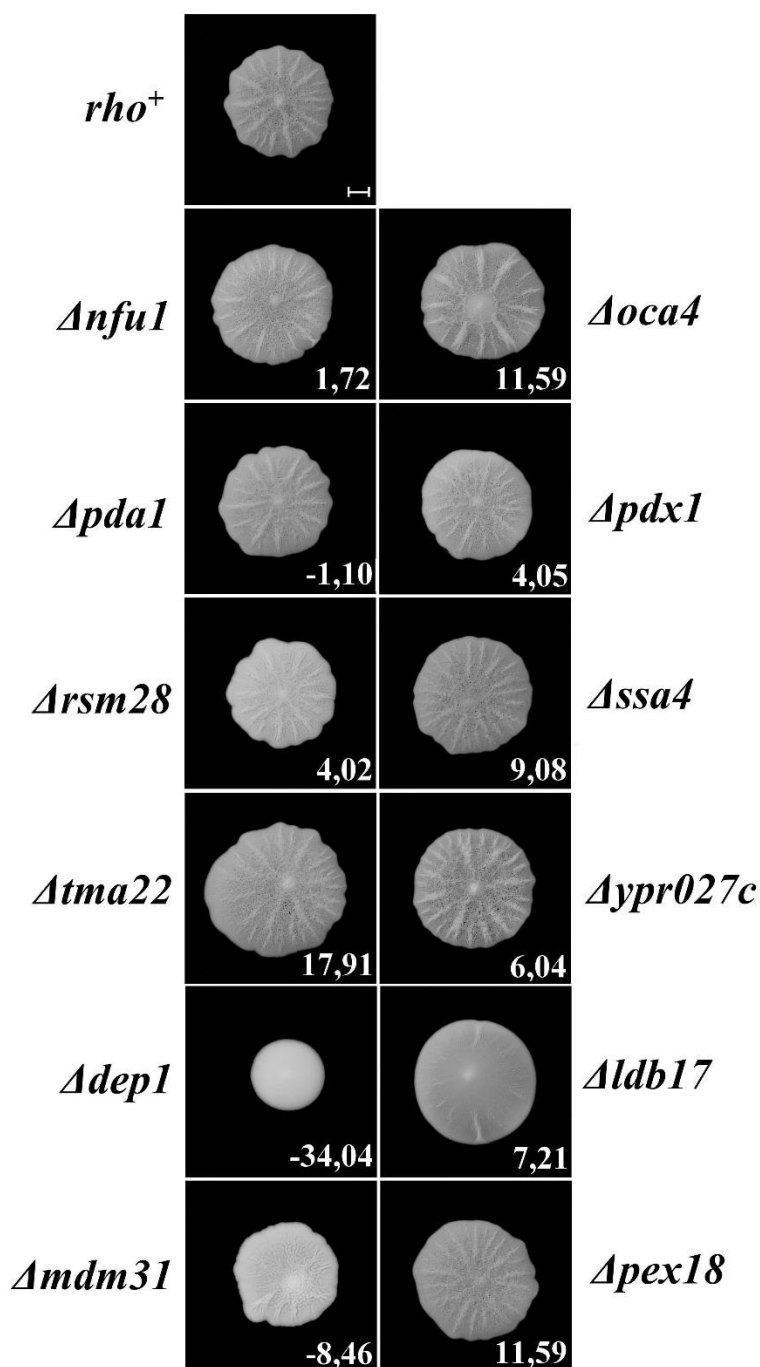
Käesolevas töös selgus, et paljude geenide deleteerimine  $\rho^+$  rakkudest ei põhjustanud hüpermattide teket nagu kirjeldasid Ryan ja teised 2012. aastal avaldatud ülegenoomses töös. Hüpermatte moodustasid 15 deletsioonimutanti. Hüpermattide skoorid jäid vahemikku 26,01 ( $\Delta pm4$ ) kuni 37,36 ( $\Delta paal1$ ) (tabel 4, lisa 6).

27 analüüsitud deletsiooni puhul lausa 12 juhul ei tekkinud hüpermatte (joonis 10, tabel 4, lisa 6). Teistest eristus selgelt *Δdep1*, mille puhul saadi matja koloonia moodustamise skooriks -34,04, mis vastab hoopis hüpomatile. Ülejäänud 11 tüvel, mille puhul samuti hüpermatti ei moodustunud, jäid skoorid vahemikku -8,46 (*Δmdm31*) kuni 17,91 (*Δtma22*). Neist eristus omakorda *Δldb17*, mille poolt moodustunud matid olid siledad ja ei omanud selliseid struktuure nagu metsiktüüpi  $\rho^+$  rakud (joonis 10, lisa 6). Lisaks eristus ka *Δmdm31*, mille matja koloonia morfoloogia erines veidi metsiktüüpi  $\rho^+$  matist (joonised 10, lisa 6). Teised hüpermatte mitte moodustavad  $\rho^+$  tüved sarnanesid morfoloogia poolest metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkude mattidega (joonis 10, lisa 6).

Kuna saadud andmed eristusid oluliselt ülegenoomses töös kirjeldatust (Ryan jt, 2012), siis analüüsiti kõikide eelnevalt nimetatud tüvede puhul vähemalt kahte teineteisest sõltumatut isolaati (andmed pole näidatud), ent saadi siiski sarnased tulemused. 2012. aastal avaldatud ülegenoomses töös analüüsiti kõikide deletsioonimutantide matjat kasvu 5 cm läbimõõduga Petri tassidel (Ryan jt, 2012). Seda korrati ka käesolevas töös. Selgus, et ka söötme kogus (9 cm läbimõõduga tassil 20 ml ja 5 cm läbimõõduga tassil 9,5 ml) pole põhjuseks, miks 12 deletsioonimutanti hüpermatti ei ole võimelised moodustama (lisa 7).

Erinevused söötme koguses põhjustasid küll mõnevõrra erinevate matjate kolooniate skooride teket (lisa 7), kuid hüpermatid moodustusid siiski samade deletsioonimutantide puhul. Need deletsioonimutandid, mis ei olnud võimelised hüpermatti moodustuma, olid samuti mõlemal juhul samad. 5 cm läbimõõduga tassidel olid hüpermattide skoorid vahemikus 26,03 (*Δymr158c-a*) kuni 32,67 (*Δpaal*). Deletsioonimutantidel, mis hüpermattideks ei klassifitseerunud olid skoorid vahemikus -10,24 (*Δgpa2*) kuni 19,06 (*Δtma22*). *Δdep1* puhul moodustus hüpomatt (skoor -35,18), nagu 9 cm läbimõõduga Petri tassilgi (skoor -34,04).

Käesolevas töös analüüsiti ka meie laboris juba varem testitud  $\rho^+$  rakkudel hüpermatte põhjustavaid deletsioonimutante. Sarnaselt varem kirjeldatuga ei moodustanud *Δgpa2* ja *Δram1* hüpermatte (lisa 8). Matja koloonia moodustumise skooriks saadi vastavalt -9,46 ja 3,95, mis küll mõnevõrra erinesid eelnevalt saadud tulemustega (vastavalt -7,3 ja -5,6 Kruuse, 2013 järgi), kuid saadud skoorid jäid sellisesse vahemikku, et neid ei saa endiselt lugeda ei hüper- ega hüpomatiks. Teised analüüsitud  $\rho^+$  tüved – *Δssk2*, *Δmsc7*, *Δsip4*, *Δshr5* moodustasid hüpermatte (lisa 8), nagu eelnevalt kirjeldatud (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013).



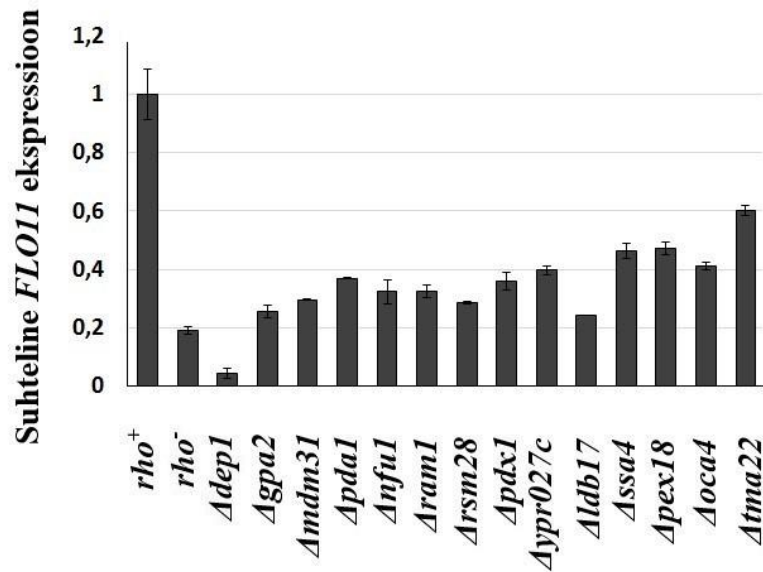
**Joonis 10.** Hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide matjad kolooniad, mis erinesid eelnevalt avaldatud ülegenoomsest uuringust. Joonisel on näidatud viis päeva 25 °C juures poolvedelal YPD söötmel kasvanud matjad kolooniad. Kõik joonisel olevad deletsioonimutandid on konstrueeritud metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> baasil. Uuritavate tüvede skoorid on arvutatud metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> tüve suhtes. Joonisel kujutatud skoorid on vähemalt kümne paralleeli keskmistatud tulemus. Mõõtjoon – 10 mm.

### 2.3.6 Hüpermattide teket põhjustavate geenide deleteerimise mõju *FLO11* ekspressioonile

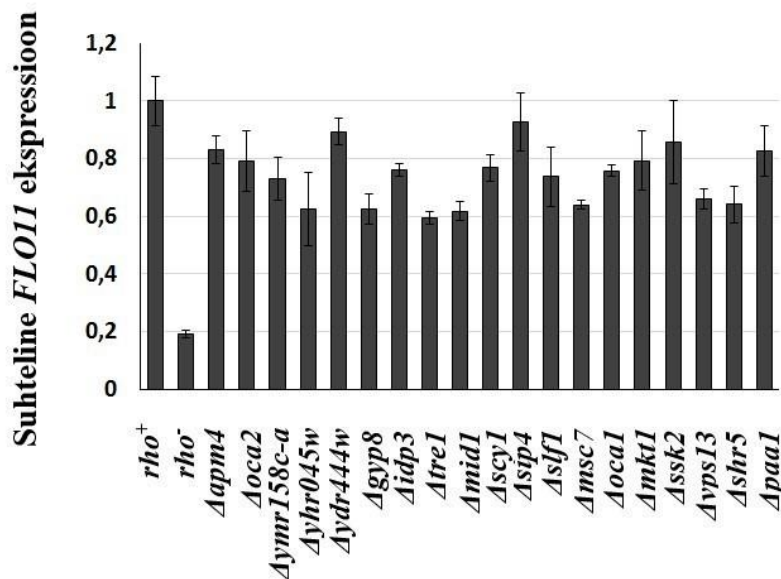
Eelnevate katsetega selgus, et paljud deletsioonimutandid, mis varem avaldatu põhjal peaksid  $\rho^+$  rakkudes põhjustama hüpermattide teket (Ryan jt, 2012), hüpermatte siiski ei moodusta. Sellest tulenevalt koguti 33 erineva  $\rho^+$  deletsioonimutandi matjate kolooniate ääreala rakud ning määrati *FLO11* ekspressioonitasemed. Eelnevalt on näidatud, et *FLO11* ekspressioonitase on matja koloonia äärealas kõrgem kui sisemises alas (Kruuse, 2013). *FLO11* ekspressioon määrati kasutades qRT-PCR meetodit ning tulemused normaliseeriti *ARP6* ja *UBC6* ekspressioonitasemete vastu. Metsiktüüpi  $\rho^+$  *FLO11* ekspressioonitase arvestati väärtuseks 1 ning teiste uuritavate ekspressioonitasemed arvutati  $\rho^+$  tüve suhtes.

Selgus, et kõikidel uuritavatel tüvedel oli *FLO11* ekspressioonitase madalam kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudes. Deletsioonimutantidel, mis käesolevas töös moodustasid hüpermatte (tabel 4, lisad 6 ja 7), oli *FLO11* ekspressioonitase 1,1-1,7 korda madalam kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudel (joonis 11B). Deletsioonimutantidel, mille matjad kolooniad ei klassifitseerunud kui hüpermatid, kuid mitte ka hüpomatid (joonis 10, tabel 4, lisad 6 ja 7), oli *FLO11* ekspressioonitase 2,1-4,2 korda madalam kui  $\rho^+$  rakkudel (joonis 11A). Erandiks oli *Atma22*, mille puhul *FLO11* ekspressioonitase langes 1,7 korda (joonis 11A). Üks deletsioonimutant, *Adep1*, klassifitseerus kui hüpomatjas (joonis 10, tabel 4, lisa 6) ning selle *FLO11* ekspressioonitase oli väga madal – 23,2 korda madalam kui  $\rho^+$  rakkudel (joonis 11A).

**A**



**B**



**Joonis 11.** *FLO11* ekspressioon hüpermatte moodustavates deletsioonimutantides. Joonisel on toodud suhteline *FLO11* ekspressioonitase metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkude suhtes, mille ekspressioonitaseme väärtuseks on arvestatud 1. A – *FLO11* ekspressioon deletsioonimutantides, mis käesolevas töös ei moodustanud hüpermatte, B – hüpermatte moodustanud deletsioonimutantide *FLO11* ekspressioon. Näidatud on vähemalt kolme paralleeli keskmistatud tulemused koos standardvigadega.

## 2.4 Arutelu

Pagaripärmi  $\Sigma 1278b$  tüve matjate kasvuvormide moodustumist pooltahkel YPD söötmel kirjeldati esmakordselt 2001. aastal (Reynolds ja Fink, 2001). Metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkude matid on struktureeritud – visuaalselt on eristatavad koloonia keskosa, sisemise ala ning ääreala rakud (Reynolds jt, 2001; joonis 2). Mittefunktsionaalse mitokondriga rakkudel on matjate kolooniate moodustumine defektne (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013).  $\rho$ -mutantide matid on suuruselt metsiktüüpi  $\rho^+$  mattidest kordades väiksemad ning neis ei eristu erinevad struktuurid. On teada, et struktureeritud mattide moodustumiseks on oluline *FLO11* ekspressioon (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012).  $\rho$ -mutandid aga ekspresseerivad *FLO11* väga madalal tasemel (Aun jt, 2013) ning see võiks olla üks põhjus, miks nad pole suutelised struktureeritud matjaid kolooniad moodustama. Seda väidet toetab ka asjaolu, et *Δflo11* tüvi moodustab  $\rho$ -mutantidega sarnaseid väikeseid sileda morfoloogiaga matte (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012).

Tihti peale annab mõne uuritava geeni deleteerimine või üleekspressioon vaid piiratud infot selle geeni bioloogilise funktsiooni kohta. Täpsemaid tulemusi saaks juhul kui uuritavat geeni oleks võimalik ekspresseerida erineva tasemega. Sel eesmärgil on konstrueeritud erineva tugevusega *TEF1* promootorite raamatukogu (Nevoigt jt, 2006), mida kasutati ka käesolevas töös. Analüüsiti, kas erinev *FLO11* ekspressioonitase võiks taastada  $\rho$ -mutantide struktureeritud mattide moodustamise võime. Selleks asendati  $\rho^-$  rakkudes *FLO11* promootor erinevate *TEF1* promootori variantidega. Töös kasutati kolme *TEF1* promootori varianti (*TEF1p3*, *TEF1p6* ja *TEF1p9*) ja algupärast *TEF1* promootorit (*TEF1p1*). *TEF1* promootorite kogu autorid ise kirjeldavad, et *TEF1p6* on kõrgema aktiivsusega kui algupärane *TEF1* promootor (*TEF1p1*) (Nevoigt jt, 2006). Käesolevas töös analüüsiti eksponentsiaalses kasvufaasis olevate erinevate *TEF1* promootori variantidega  $\rho^-$  rakkude *FLO11* ekspressioonitasemeid (joonis 5). Leiti, et ekspressioonitasemed olid selgelt erinevad. Ootuspäraselt oli  $\rho^-$  *TEF1p6* rakkude puhul *FLO11* ekspressioonitase kõrgem (1,2 korda) kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudel. Lähtuvalt sellest, et tüvedel olid erinevad *FLO11* ekspressioonitasemed, analüüsiti ka samade tüvede invasiivset kasvu, kuna on teada, et see on tugevas sõltuvuses *FLO11* ekspressioonist (Guo jt, 2000). Invasiivse kasvu tugevus tõepoolest korreleerus eksponentsiaalses kasvufaasis olevate rakkude *FLO11* ekspressioonitasemetega (joonis 6). *FLO11* promootori asendamist erinevate *TEF1* promootori variantidega on kasutatud ka koloonia morfoloogia analüüsil (Voordeckers jt, 2012). Selles uuringus leiti korrelatsioon *FLO11* ekspressioonitaseme ja keerukama koloonia morfoloogia vahel. Mida kõrgem oli *FLO11* ekspressioonitase, seda kortsulisemad olid  $\rho^+$  rakkude kolooniad.



Mitte ühegi käesolevas töös kasutatud *TEF1* promootori variandi asendamine *FLO11* promootoriga ei taastanud *rho*-mutantide matjate kolooniate moodustumise võimet metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega samale tasemele (joonis 7). Kui tavapärased *rho*-mutantide (*rho*<sup>-</sup>, *Δmip1*) matid on väikesed ja struktuurilt siledad, siis eelnevalt nimetatud promootorite mutatsioonidega *rho*<sup>-</sup> rakkudes olid küll matid väikesed ja siledad, ent äärtest rohkem või vähem sakilised (joonis 7). Matjatest kolooniast kogutud rakkudes oli *FLO11* tase madalam kui eksponentsiaalses kasvufaasis olevates rakkudes (joonis 8). Kõik *TEF1* promootori variatsioonid suurendasid *FLO11* ekspressioonitaset *rho*<sup>-</sup> rakkudes, mis olid kogutud matjatest kolooniast. Samas jäid kõik ekspressioonitasemed tunduvalt nõrgemateks kui see oli *rho*<sup>+</sup> rakkudes. Seetõttu võib oletada, et rakkude hingamisvõime säilimine on struktureeritud matja koloonia moodustumisel äärmiselt oluline. Oletatakse, et struktureeritud matja koloonia pind on seetõttu kortsuline, et see suurendab gaasivahetuseks vajalikku pindala (Voordeckers jt, 2012). Võimalik, et *FLO11* ekspressioonitase ja kortsulise koloonia pind aitavad säilitada tasakaalu hingamise ja fermentatsiooni vahel. Kuna *rho*-mutandid on respiratoorselt defektsed, seletaks see asjaolu, miks nende matjad kolooniad ei ole kortsulised. Samas ekspresseerivad *rho*-mutandid palju madalamal tasemel *FLO11* (Aun jt, 2013; joonised 5 ja 8), kuid *FLO11* ekspressioonitaseme taastamine metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega samale tasemele ei põhjusta samuti struktureeritud matjate kolooniate teket (joonis 7). Seega ei ole *rho*-mutantide puhul matja koloonia erinevate struktuuride teke sõltuv ainult *FLO11* ekspressioonist, vaid olulised võivad olla veel teised rakupinna valgud, mille ekspresseerumine võib omakorda olla reguleeritud mittefunktsionaalse mitokondri poolt.

Käesoleva töö teine suurem eesmärk oli analüüsida geneetilisi interaktsioone hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel. 2012. aastal avaldati ülegenoomne töö, milles kirjeldati matjate kolooniate tekkeks vajalikke geene (Ryan jt, 2012). Käesolevas töös analüüsiti geneetilisi interaktsioone 27 hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel. Analüüsitud deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel geneetilisi interaktsioone ei leitud. Kõik vastavate geenide deletsioonid (tabel 2) põhjustasid *rho*<sup>-</sup> või *Δmip1* tüvedes vaid väikeste ja struktuuritute mattide teket, mis klassifitseerusid kui hüpomatid. Samas selgus, et paljud analüüsitud *rho*<sup>+</sup> rakkude deletsioonimutandid ei moodusta samuti hüpermatte, nagu seda eelnevalt ülegenoomses töös oli avaldatud (Ryan jt, 2012). Seda, et kõik ülegenoomses töös hüpermatte moodustunud tüved neid siiski ei moodusta, on meie laboris juba varem kirjeldatud. Nendest kuuest deletsioonimutandist, mis olid varem analüüsitud (tabel 3), ei moodustanud hüpermatte kaks (Kruuse, 2013). Võimalik, et need deletsioonimutandid, mille puhul käesolevas töös

hüpermatjat kolooniat ei tekkinud, moodustavadki väga varieeruva suurusega matte. Samas analüüsi käesolevas töös vähemalt kahte teineteisest sõltumatut transformanti (andmed pole näidatud), mis käitusid mattide moodustumisel väga sarnaselt. Testiti ka, kas erinev pooltahke YPD söötme kogus võiks mõjutada  $\rho^+$  rakkude matjaid struktuure. Erinev söötme kogus ei mõjunud mattide moodustumisele märkimisväärselt erinevalt (lisa 7). Seega ei ole söötme kogus antud kontekstis oluline. Tüved, mis hüpermatte ei moodustanud, ei teinud seda kummalgi juhul – ei 9 cm ega 5 cm läbimõõduga Petri tassidel.

Põhjuseid, miks käesolevas töös saadi erinevad tulemused varasemalt avaldatud ülegenoomsest tööst, võib olla mitmeid. Kuna ülegenoomse töö puhul on maht kordades suurem kui näiteks käesolevas töös, on võimalus valepositiivseteks ja –negatiivseteks suurem. Ryan ja kaasautorid toovad samas välja, et matjate kolooniate puhul on võimalus valepositiivsete tulemuste esinemiseks vaid ligikaudu 2% (Ryan jt, 2012). Samas on matjate kolooniate moodustumist nimetatud uuringus testitud vaid kaks korda. Ülegenoomse uuringu autorid on analüüsinud ka seda, kui paljud tulemused korreleeruvad varem avaldatuga (Ryan jt, 2012). Näiteks invasiivse kasvu puhul said nad varem avaldatuga 49 juhul samad tulemused ning erinevad tulemused 16 juhul. Diploidse pseudohüüfse kasvu puhul saadi varem avaldatuga palju rohkem erinevaid tulemusi – lausa 37 juhul, samas kui 31 juhul olid tulemused samad. Teine võimalus, miks nii palju erinevusi tekkis, võib olla seotud *FLO11*-ga. Kuna *FLO11* ekspressioon on reguleeritud nii transkriptsioonilisel kui ka epigeneetilisel tasandil, siis võimalik, et just epigeneetiline regulatsioon on põhjuseks, miks saadakse erinevaid tulemusi varasemalt avaldatud töödega.

Nagu eelnevalt mainitud, on näidatud *FLO11* olulisust matjate struktuuride moodustumisel (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012). Seetõttu analüüsi kõigi 33  $\rho^+$  baasil konstrueeritud deletsioonimutandi *FLO11* ekspressioonitasemeid. Selgus, et erinevatel deletsioonimutantidel *FLO11* ekspressioonitasemed tõesti erinesid (joonis 11). Deletsioonimutandid, mis moodustasid hüpermatte, ekspresseerisid 1,1-1,7 korda madalamal tasemel *FLO11* kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakud (joonis 11B). Kui analüüsi deletsioonimutante, mis ei moodustanud hüpermatte, olid *FLO11* ekspressioonitasemed tunduvalt madalamad (2,1-4,2 korda) kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudel (joonis 11A). Deletsioonimutandid, mis hüpermatte ei moodustanud, olid suures osas morfoloogiliselt sarnased metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkude matjate kolooniatega (joonis 10, lisa 6). Teistest eristusid *Agpa2*, *Aram1*, *Aldb17* ja *Adep1*. *GPA2* deleteerimisel olid matjad kolooniad üsna struktuuritud. Gpa2 vastutab cAMP-PKA rajas glükoosi ära tundmise eest (Colombo jt, 1998) ning cAMP-PKA rada on oluline ka *FLO11* regulatsioonil (Robertson ja Fink, 1998; Pan ja Heitman, 1999; joonis 4). *GPA2*

deleteerimise mõju on uuritud ka eelnevalt mainitud koloonia morfoloogia uuringus (Voordeckers jt, 2012). *Agpa2* moodustab peaaegu siledaid kolooniaid. Sarnaseid kolooniaid moodustab ka *Aflo11*. Lähtudes nimetatud koloonia morfoloogia uuringust, tundub *Agpa2* poolt moodustatav matjas koloonia ootuspärane. Näiteks puudub *Agpa2* tüvel ka invasioonivõime (Harashima ja Heitman, 2002). Lisaks oli matjast kolooniast kogutud *Agpa2* rakkude *FLO11* ekspressioonitase väga madal (neli korda madalam kui metsiktüüpi  $\rho^+$ -l) (joonis 11). *RAM1* deleteerimisel on matjad kolooniad samuti üsna struktureeritud. Ka *Aram1* puhul on analüüsitud koloonia morfoloogiat (Voordeckers jt, 2012). *RAM1* deleteerimise tulemusena on koloonia kortsuline, mis viitab sellele, et selles deletsioonimutandis peaks *FLO11* ekspressioon olema tugevam. Käesolevas töös selgus aga, et matjatest kolooniast kogutud *Aram1* rakkudes on madal *FLO11* ekspressioonitase (kolm korda madalam kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudel) (joonis 11). *Aram1* tüvel on uuritud ka adhesiooni polüstüreenile ning leitud, et sellel tüvel on adhesioonivõime vähenenud (Andersen jt, 2014). *LDB17* deleteerimisel moodustusid samuti metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudest väiksemad matjad kolooniad, mis olid suhteliselt siledad ja struktureeritud (joonis 10, lisa 6). Pagaripärmi S288c tüve puhul on näidatud, et kui *LDB17* deleteerida, on adhesioon plastikule vähenenud (Vandenbosch jt, 2013). *Aldb17* tüvel on ka *FLO11* ekspressioonitase madal (ligikaudu neli korda madalam kui metsiktüüpi  $\rho^+$  rakkudel) (joonis 11A).

Teistest analüüsitud  $\rho^+$  deletsioonimutantide mattidest eristus oluliselt *Adep1*. Moodustunud matt klassifitseerus skoori poolest hüpomatjaks (tabel 4). *Adep1* matjas koloonia oli täiesti struktureeritu ning ühtlaselt sile (joonised 9 ja 10, lisa 6). Kuna ülegenoomses töös avaldatu põhjal pidi *Adep1* puhul tegemist olema hüpermatti moodustava tüvega, oli saadud tulemus väga üllatav. Lisaks kontolliti matjate kolooniate moodustumist kahel teineteisest sõltumatul isolaadil (andmed pole näidatud) ja saadi kinnitust, et fenotüübilt on tegemist hüpomatiga. Selleks, et kindel olla, et *Adep1* puhul ei ole juhuslikult tegemist  $\rho$ -mutandiga, külvati tüve kaks sõltumatut isolaati YPG tardsöötmele (andmed pole näidatud). Kuna YPG sööde sisaldab süsinikuallikana glütserooli, mis on mittefermenteeritav süsinikuallikas, siis  $\rho$ -mutandid sellisel söötmel kasvada ei suuda. Selgus, et *Adep1* tüve mõlemad isolaadid kasvasid YPG-l, mistõttu saab kindlalt väita, et tegemist on  $\rho^+$  tüvega. Dep1 näol on aga tegemist Rpd3L histoonide deatsetüleerimise kompleksi komponendiga (Lamping jt, 1995). Rpd3L kompleks moodustub järgnevatest komponentidest: Pho23, Sap30, Rxt2, Sds3, Rpd3, Sin3, Ash1, Ume1, Cti6, Rxt3, Ume6 ja Dep1 (Carrozza jt, 2005). Rpd3L kompleks osaleb ka *FLO11* epigeneetilisel regulatsioonis (Bumgarner jt, 2009; Barrales jt, 2012; Bumgarner jt, 2012). Mõnevõrra üllatuslikult on leitud, et nimetatud kompleks hoopis aktiveerib *FLO11*,

mitte ei inaktiveeri, nagu seda teeb näiteks histooni deasetülaas Hda1 (Halme jt, 2004). Dep1 puhul ei ole näidatud otsest osalust *FLO11* epigeneetilisel regulatsioonil. Kuna *Δdep1* tüve matjatest kolooniatest kogutud rakkudes on äärmiselt madal *FLO11* ekspressioonitase, võib oletada, et Dep1 on oluline *FLO11* regulatsioonil. Võrreldes metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega on *Δdep1* tüves 23,2 korda madalam *FLO11* ekspressioonitase (joonis 11A), mis on tunduvalt madalam kui *rho*-mutantidel. Näiteks *Δdep1* tüvel puudub ka invasiivne kasv (Ryan jt, 2012) ja see on korrelatsioonis *FLO11* ekspressioonitasemega.

Käesoleva töö tulemuste põhjal saab väita, et *FLO11* ekspressioonitase on väga oluline matjate kolooniate moodustumiseks. Hüpermatte moodustavad tüved ekspresseerivad *FLO11* kõrgema tasemega kui väiksemate matja koloonia moodustumise skooridega tüved. Samas moodustasid ka teised *rho*<sup>+</sup> deletsioonimutandid metsiktüüpi rakkudega sarnase morfoloogiaga matte. Seetõttu võinuks oletada, et neis ekspresseerub samuti *FLO11* kõrgemal tasemel, kuid selgus, et *FLO11* ekspressioonitase oli nendes rakkudes aga enamasti madalam (joonis 11). Arvatakse, et Flo11 posttranslatsiooniline lõikamine ja selle rakust välja sekreteerimine on oluline libisevaks kasvuks pooltahkel pinnal (Karunanithi jt, 2010). On näidatud, et matja koloonia ääreala rakkudes on *FLO11* ekspressioonitase kõrgem kui sisemistes rakkudes (Kruuse, 2013), mis viitab sellele, et *FLO11* kõrgem ekspressioon on tõesti libisevaks kasvuks tähtis. Samas näiteks *Δsfl1* tüvel, mis ekspresseerib küll kõrgemal tasemel *FLO11* kui metsiktüüpi rakud, on mati moodustumine defektne (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013). *Δsfl1* tüve mattidel suureneb matja koloonia kõrgus, mis viitab sellele, et libiseva kasvu asemel toimub tugev adhesioon (Kruuse, 2013). Võimalik, et *FLO11* ekspresseeritakse liiga palju ja proteaasid ei jõua Flo11 lahti lõigata ja ümbrusesse sekreteerida, mistõttu rakud libisevalt ei kasva. Seetõttu võib ka käesolevas töös analüüsitud matjate kolooniate moodustumise puhul kehtida sama reegel. Võimalik, et hüpermatid tekivad siis, kui *FLO11* ekspresseeritakse veidi madalamalt kui metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudes. Kui *FLO11* ekspressioon on liiga kõrge, jäävad rakud üksteise külge kinni ja ei saa libisevalt kasvada. Kui aga vähemalt üle kahe korra madalam kui metsiktüübi puhul, ei ole *FLO11* ekspressioon piisav, et moodustuksid hüpermatid. Veel võib oletada, et lisaks *FLO11*-le on vajalik veel mõne teise geeni ekspressioon. Seega on väga võimalik, et *FLO11* on küll väga vajalik, kuid ei ole ainus geen, mille ekspresseerumine põhjustab matjate struktuuride teket. Seega tundub, et matjate kolooniate moodustumiseks võib vajalik olla palju suurem regulaatorite võrgustik.

## Kokkuvõte

Pagaripärmi rakkudel esineb libisev kasv pooltahkel söötmel ning selle toimumiseks on vajalik *FLO11* ekspressioon (Reynolds ja Fink, 2001; Reynolds jt, 2008; Ryan jt, 2012). *Rho*-mutandid ei ole võimelised moodustama sama suuri ja struktureeritud matjaid kolooniad nagu metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakud (Ryan jt, 2012; Kruuse, 2013). Võimalik, et see on põhjustatud *FLO11* madalast ekspressioonitasemest, sest *rho*-mutantides ekspresseerub *FLO11* ligikaudu neli korda madalamalt kui metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudes (Aun jt, 2013).

Käesoleva töö esimeseks eesmärgiks oli analüüsida, kas erinev *FLO11* ekspressioonitase mõjutab *rho*-mutantide matjate kolooniate moodustumist. Selleks asendati *rho*<sup>-</sup> rakkude genoomis *FLO11* promootor erinevate *TEF1* promootori variantidega (*TEF1p1*, *TEF1p3*, *TEF1p6*, *TEF1p9*). Saadud tüvedes määrati *FLO11* ekspressioonitasemed eksponentsiaalses kasvufaasis olevates rakkudes qRT-PCR meetodiga. Kõikides uuritud tüvedes oli *FLO11* ekspressioonitase kõrgem kui *rho*<sup>-</sup> rakkudes. Kui võrrelda ekspressiooni *rho*<sup>+</sup> rakkudega, detekteeriti tugevam *FLO11* ekspressioonitase *TEF1p6* puhul (1,2 korda kõrgem kui *rho*<sup>+</sup> rakkudes), nõrgim *TEF1p3* ja *TEF1p9* puhul (2,2 korda madalam kui *rho*<sup>+</sup> rakkudes). Kuna pagaripärmi invasiivne kasv on tugevas sõltuvuses *FLO11* ekspressioonist, analüüsiti samade tüvede invasioonivõimet. Leiti, et invasiivse kasvu tugevus korreleerub eksponentsiaalses kasvufaasis määratud *rho*<sup>-</sup> rakkude *FLO11* ekspressioonitasemega. Järgnevalt analüüsiti samade tüvede matjate kolooniate moodustumisvõimet. Mitte ükski *TEF1* promootori variandiga *rho*<sup>-</sup> tüvi ei saavutanud metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudega samasugust matja koloonia morfoloogiat. Matjate kolooniate skoorid jäid vahemikku -51,23 kuni -44,28. Sellest lähtuvalt analüüsiti, millised on samade tüvede matjatest kolooniast kogutud rakkude *FLO11* ekspressioonitasemeid. Selgus, et *FLO11* tase on kõikides erineva *TEF1* promootori variantidega rakkudes madalam kui *rho*<sup>+</sup> rakkudes – 2,1-11,1 korda. *Rho*<sup>-</sup> tüve suhtes olid ekspressioonitasemed 1,1-2,5 korda kõrgemad ning *TEF1p9* puhul 2,1 korda madalam.

Töö teine suurem eesmärk oli analüüsida, kas esineb geneetilisi interaktsioone hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel. Ülegenoomses töös näidati, et 33 geeni deleteerimisel tekivad pagaripärmi rakkudel hüpermatjad struktuurid (Ryan jt, 2012). Geneetilisi interaktsioone *rho*-mutantidega oli meie laboris uuritud neist kuuel. Käesolevas töös uuriti ülejäänud 27. Hüpermattide teket põhjustavate deletsioonimutantide ja *rho*-mutantide vahel ei leitud geneetilisi interaktsioone. Kõik *rho*-mutantide poolt moodustunud matjad kolooniad klassifitseerusid kui hüpomatid, mille skoorid jäid vahemikku -50,99 kuni -39,16. Üllatavalt leiti, et paljud *rho*<sup>+</sup> tüve baasil konstrueeritud deletsioonimutandid ei ole võimelised hüpermatte moodustama. Analüüsitud 27-st deletsioonimutandist 15 moodustasid

hüpermatte, 12 mitte. Hüpermattide skoorid jäid vahemikku 26,01 kuni 37,36. Hüpermatte mitte moodustavate tüvede skoorid jäid vahemikku -8,46 kuni 17,91. Erandiks oli *Δdepl*, mille matja koloonia moodustumise skoor oli -34,04, mis klassifitseerub kui hüpomatt. Kõikidel 33 *rho*<sup>+</sup> baasil konstrueeritud deletsioonimutantide matjate kolooniate rakkudel määrati qRT-PCR meetodiga *FLO11* ekspressioonitasemed. Selgus, et hüpermatte moodustavates rakkudes on *FLO11* peaaegu sama kõrge kui metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakkudes. Deletsioonimutantides, mis ei moodustanud hüpermatte, olid *FLO11* ekspressioonitasemed madalamad – 2,1-4,2 korda. Erandiks oli *Δtma22*, mille *FLO11* tase oli 1,7 korda madalam kui *rho*<sup>+</sup> rakkudel. Kõige madalam *FLO11* ekspressioonitase oli *Δdepl* rakkudel – 23,2 korda madalam kui *rho*<sup>+</sup> rakkudel.

Mitte ükski käesolevas töös analüüsitud *rho*-mutant ei moodustanud struktureeritud ja sama suuri matjaid kolooniaid nagu metsiktüüpi *rho*<sup>+</sup> rakud, mistõttu on võimalik, et signaalid, mis matja koloonia moodustumiseks on tähtsad, on seotud funktsionaalse mitokondriga. Teisalt selgus veel, et *FLO11* ekspressioon on väga vajalik matjate kolooniate moodustumiseks, ent ilmselt ei ole tegemist ainsa geeniga, mille ekspresseerumine selleks oluline on.

## The expression of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm mat-forming cells

Geidi Mitt

### Summary

The unicellular baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* can adopt several multicellular lifestyles, depending on different environmental stimuli. Multicellular lifestyles of yeasts play an important role in industries and medicine. For instance, biofilms are one of the many multicellular lifestyles of pathogenic yeast, which can cause nosocomial infections. Since *Saccharomyces cerevisiae* is rarely harmful, it is a good model for studying fungal biofilms.

*Saccharomyces cerevisiae* is able to initiate biofilm formation in two ways. First, baker's yeast has the ability to adhere to abiotic surfaces, such as plastic, and is also capable of forming complex colonies called mats as a result of sliding motility. Mats are formed on semisolid (0,3%) agar and depend on the expression of a cell surface glycoprotein Flo11. So far, the role of mitochondrial DNA in mat formation is unknown, yet it has been shown that *rho*-mutants lack the ability to form as complex mats as the wild type *rho*<sup>+</sup> cells. Moreover, the expression of *FLO11* in *rho*-mutants is at least four times lower than in *rho*<sup>+</sup> cells.

Thus, the aim of this study was to analyze whether the increased expression of *FLO11* causes *rho*-mutants to form as complex mats as the *rho*<sup>+</sup> cells. Therefore, the *FLO11* promoter in *rho*<sup>-</sup> cells' genome was replaced by different *TEF1* promoter variants (*TEF1p1*, *TEF1p3*, *TEF1p6*, *TEF1p9*). Then the expression of *FLO11* was measured from exponentially growing cells. Compared to *rho*<sup>-</sup> cells, the expression of *FLO11* was stronger in *rho*<sup>-</sup> cells with different *TEF1* promoters. Compared to *rho*<sup>+</sup> cells, the expression was stronger in *rho*<sup>-</sup> *TEF1p6* cells (1.2 times stronger). *TEF1p3* and *TEF1p9* showed the weakest expression levels (2.2 times weaker than in *rho*<sup>+</sup> cells). As it has been shown before, stronger *FLO11* expression correlates with stronger invasive growth. Therefore, invasive growth of *rho*<sup>-</sup> mutants showing different *FLO11* expression levels, was tested. As a result of the experiments, stronger invasive growth indeed correlated with stronger *FLO11* expression.

Next, mat formation of *rho*<sup>-</sup> cells showing different *FLO11* expression levels, was analyzed. None of the analyzed *rho*<sup>-</sup> mutants showed as complex mats as the wild type *rho*<sup>+</sup> cells. The biofilm scores of these mutants ranged between -51.23 and -44.28. In addition, the expression of *FLO11* from those mats was analyzed. The expression levels of *FLO11* were 2.1-11.1 times lower than in wild type *rho*<sup>+</sup> cells. Compared to *rho*<sup>-</sup> cells, the expression was 1.1-2.5 times stronger, and 2.1 times lower in case of *TEF1p9*.

As well as that, another aim of this study was to analyze if there are genetic interactions between *rho*-mutants and deletion mutants that cause cells to form hypermats. Global gene deletion analysis showed that there are 33 genes that are involved in hypermat formation. The genetic interactions of six of them have been analyzed in our laboratory before. In this study, the remaining 27 gene deletions were analyzed. As a result of the experiments, it became clear that there are no genetic interactions between *rho*-mutants and deletion mutants that cause hypermat formation. All the analyzed *rho*-mutants showed only poor mat formation, which classified as hypomats. The biofilm scores ranged between -50.99 and -39.16. Surprisingly, it was found that many of the deletion mutants did not cause hypermat formation in *rho*<sup>+</sup> cells. Of the analyzed 27 deletion mutants, 15 were able to form hypermats, and 12 were not. The biofilm scores of hypermats ranged between 26.01 and 37.36. The biofilm scores of the ones that were not able to form hypermats, ranged between -8.46 and 17.91. There was one exception, *Δdep1*, which had the biofilm score only -34.04 and it classified as a hypomat. Next, the expression of *FLO11* from all of the 33 deletion mutant's mats was measured. It appeared that the deletion mutants which formed hypermats, had almost as high *FLO11* expression levels as in wild type *rho*<sup>+</sup> cells. Deletion mutants that were not able to form hypermats, had about 2.1-4.2 times lower *FLO11* expression levels. There was one exception, *Δtma22*, which had only 1.7 times lower *FLO11* expression level. The lowest *FLO11* expression level was in *Δdep1* cells, it was 23.2 times lower than in wild type *rho*<sup>+</sup> cells.

Overall, none of the analyzed *rho*-mutants formed as big and complex mats as wild type *rho*<sup>+</sup> cells. Therefore, it is possible that the essential signals for complex mat formation are linked to functional mitochondria. As well as that, it became clear that the expression of *FLO11* is important for mat formation, but apparently there may be some other genes involved as well.



## Kasutatud kirjandus

1. Andersen K. S., Bojsen R., Sorensen L. G. R., Nielsen M. W., Lisby M., Folkesson A., Regenborg B. (2014) Genetic basis for *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in liquid meedium. *G3* **4**: 1671-1680.
2. Aun A., Tamm T., Sedman J. (2013) Dysfunctional mitochondria modulate cAMP-PKA signaling and filamentous and invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 467-481.
3. Barrales R. R., Jimenez J., Ibeas J. I. (2008) Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 145-156.
4. Barrales R. R., Korber P., Jimenez J., Ibeas J. I. (2012) Chromatin Modulation at the *FLO11* Promoter of *Saccharomyces cerevisiae* by HDAC and Swi/Snf Complexes. *Genetics* **191**: 791-803.
5. Beauvais A., Loussert C., Prevost M. C., Verstrepen K., Latgé J. P. (2009) Characterization of a biofilm-like extracellular matrix in *FLO1*-expressing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res* **9**: 411-419.
6. Brückner S., Mösch H-U. (2012) Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 25-58.
7. Bumgarner S. L., Dowell, R. D., Grisafi P., Gifford D. K., Fink G. R. (2009). Toggle involving cis-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *PNAS* **106**: 18321-18326.
8. Bumgarner S. L., Neuert G., Voight B. F., Symbor-Nagrabska A., Grisafi P., van Oudenaarden A., Fink G. R. (2012) Single-Cell Analysis Reveals that Noncoding RNAs Contribute to Clonal Heterogeneity by Modulating Transcription Factor Recruitment. *Mol Cell* **45**: 470-482.
9. Čap M., Vachova L., Palkova Z. (2010) How to survive within a yeast colony? Change metabolism or cope with stress? *Comm Integr Biol* **3**: 198-200.
10. Caro L. H. P., Tettelin H., Vossen J. H., Ram A. F. J., Van Den Ende H., Klis F. M. (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidyl-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477-1489.
11. Carrozza M. J., Florens L., Swanson S. K., Shia W. J., Anderson S., Yates J., Washburn M. P., Workman J. L. (2005) Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 77-87.
12. Chen H., Fink G. R. (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20**: 1150-1161.

13. Colombo S., Ma P., Cauwenberg .L, Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J. H., Gorwa M. F., Colavizza D., Thevelein J. M. (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 3326-3341.
14. Conlan R. S., Tzamarias D. (2001) Sfl1 functions via the corepressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**: 1007-1015.
15. Contamine V., Picard M. (2000) Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 281-315.
16. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
17. Cullen P. J., Sprague G. F. Jr. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *PNAS* **97**: 13619-13624.
18. Cullen P. J., Sprague G. F. Jr. (2012) The regulation in filamentous growth in yeast. *Genetics* **190**: 23-49.
19. Dickinson J. R. (1996) 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast. *Microbiol* **142**: 1391-1397.
20. Donlan R. M., Costerton J. W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.
21. Douglas L. M., Li L., Yang Y., Dranginis A. M. (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryotic Cell* **6**: 2214-2221.
22. Dranginis A. M., Rauceo J. M., Coronado J. E., Lipke P. N. (2007) A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 282-294.
23. Dujon B. (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* **12**: 263-270.
24. Faye G., Fukuhara H., Grandchamp C., Lazowska J., Michel F., Casey J., Getz G. S., Locker J., Rabinowitz M., Bolotin-Fukuhara M., Coen D., Deutsch J., Dujon B., Netter P., Slonimski P. P. (1973) Mitochondrial nucleic acids in the petite colonie mutants: deletions and repetition of genes. *Biochimie* **55**: 779-792.
25. Foury F. (1989) Cloning and sequencing of the nuclear gene *MIP1* encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* **264**: 20552-20560.
26. Foury F., Roganti T., Lecrenier N., Purnelle B. (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **440**: 325-331.

27. Frieman M. B., Cormack B. P. (2004) Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol* **150**: 3105-3114.
28. Gancedo J. M. (2001) Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 107-123.
29. Gimeno C. J., Fink G. R. (1994) Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**: 2100-2112.
30. Gimeno C. J., Fink G. R. (1992) The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**: 626.
31. Gimeno C. J., Ljungdahl P. O., Styles C. A., Fink G. R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
32. Greenleaf A. L., Kelly J. L., Lehman I. R. (1986) Yeast *RPO41* gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *PNAS* **83**: 3391-3394.
33. Guo B., Styles C. A., Feng Q., Fink G. R. (2000) A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell–cell adhesion, and mating. *PNAS* **97**: 12158–12163.
34. Hansen E. C. (1883) Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. V. Méthodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces* et de microorganismes analogues. *CR Trav Lab Carlsb* **2**: 92–105.
35. Harashima T., Heitman J. (2002) The G $\alpha$  protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat protein that mimic G $\beta$  subunits. *Mol Cell* **10**: 163-173.
36. Hedbacker K., Carlson M. (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* **13**: 2408-2420.
37. Ishigami M., Nakakawa Y., Hayakawa M., Iimura Y. (2006) *FLO11* is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 660-666.
38. Jin R., Dobry C. J., McCown P. J., Kumar A. (2008) Large-scale analysis of yeast filamentous growth by systematic gene disruption and overexpression. *Mol Biol Cell* **19**: 284-296.
39. Kang C. M., Jiang Y. W. (2005) Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast* **22**: 79-90.
40. Kern K., Nunn C. D., Pichova A., Dickinson J. R. (2004) Isoamyl alcohol-induced morphological change in *Saccharomyces cerevisiae* involves increases in mitochondria and cell wall chitin content. *FEMS Yeast Res* **5**: 43-49.

41. Kim J., Sudbery P. (2011) *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol* **49**: 171-177.
42. Knop M., Siegers K., Pereira G., Zachariae W., Winsor B., Nasmyth K., Schiebel E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963-972.
43. Kobayashi O., Yoshimoto H., Sone H. (1999) Analysis of the genes activated by the *FLO8* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **36**: 256-261.
44. Kojic E. M., Darouiche R. O. (2004) Candida infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-267.
45. Kron S. J., Styles C. A., Fink G. R. (1994) Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**: 1003-1022.
46. Kruuse K. (2013) Mittefunktsionaalse mitokondri mõju *Saccharomyces cerevisiae* matja struktuuriga kolooniate kasvule. Tartu Ülikool, magistritöö.
47. Kuchin S., Vyas V. K., Carlson M. (2002) Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3994-4000.
48. Kuthan M., Devaux F., Janderova B., Slaninova I., Jacq C., Palkova Z. (2003) Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol Microbiol* **47**: 745-754.
49. Kübler E., Mösch H-U., Rupp S., Lisanti P. (1997) Gpa2p, a G protein  $\alpha$ -subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 20321-20323.
50. Lamb T. M., Mitchell A. P. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMPI* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 677-686.
51. Lamb T. M., Xu W., Diamond A., Mitchell A. P. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* **276**: 1850-1856.
52. Lambrechts M. G., Bauer F. F., Marmur J., Pretorius I. S. (1996) Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *PNAS* **93**: 8419-8424.
53. Lamping E., Lückl J., Paltauf F., Henry S. A., Kohlwein S. D. (1995) Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* with pleiotropic deficiencies in transcriptional activation and repression. *Genetics* **137**: 55-65.
54. Lamprecht M. R., Sabatini D. M., Carpenter A. E. (2007) CellProfiler: free, versatile

- software for automated biological image analysis. *BioTechniques* **42**: 71-75.
55. Liu H., Styles C. A., Fink G. R. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967-978.
  56. Lo W-S., Dranginis A. M. (1996) *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**: 7144-7151.
  57. Lo W-S., Dranginis A. M. (1998) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 161-171.
  58. Lorenz M. C., Cutler N. S., Heitman J. (2000) Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 183-199.
  59. Lorenz M. C., Heitman J. (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G protein  $\alpha$  homolog. *EMBO J* **16**: 7008-7018.
  60. Lõoke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques* **50(5)**: 325-328.
  61. Malcher M., Schladebeck S., Mösch H-U. (2011) The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717-730.
  62. Martineu C. N., Beckerich J-M., Kabani M. (2007) Flo11p-independent control of „mat“ formation by Hsp70 molecular chaperones and nucleotide exchange factors in yeast. *Genetics* **177**: 1679-1689.
  63. Mitt G. (2013) Defektse mitokondriaalse DNA mõju *Saccharomyces cerevisiae* rakkude adhesioonile. Tartu Ülikool, bakalaureusetöö.
  64. Miyakawa L., Aoi H., Sando N., Kuroiwa T. (1984) Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **66**: 21-38.
  65. Nevoigt E., Kohnke J., Fischer C. R., Alper H., Stahl U., Stephanopoulos G. (2006) Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5266-5273.
  66. Palkova Z., Janderova B., Gabriel J., Zikanova B., Pospisek M., Forstova J. (1997) Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* **370**: 532-536.
  67. Pan X., Heitman J. (1999) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 4874-4887.
  68. Pan X., Heitman J. (2000) Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell–cell adhesion. *Mol Cell Biol* **20**: 8364-8372.

69. Perocchi F., Jensen L. J., Gagneur J., Ahting U., von Mering C., Bork P., Prokisch H., Steinmetz L. M. (2006) Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle, *PLoS Genet* **2**: e170.
70. Purevdorj-Gage B., Orr M. E., Stoodley P., Sheehan K. B., Hyman L. E. (2007) The role of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *FEMS Yeast Res* **7**: 372-379.
71. Ralser M., Kuhl H., Ralser M., Werber M., Lehrach H., Breitenbach M., Timmermann B. (2012) The *Saccharomyces cerevisiae* W303-K6001 cross-platform genome sequence: insights into ancestry and physiology of a laboratory mutt. *Open Biol* **2**: 1-9.
72. Reynolds T. B., Fink G. R. (2001) Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878-881.
73. Reynolds T. B., Jansen A., Peng X., Fink G. R. (2008) Mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* requires nutrient and pH gradients. *Eukaryotic Cell* **7**: 122-130.
74. Roberts R. L., Fink G. R. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-2985.
75. Robertson L. S., Fink G. R. (1998) The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *PNAS* **95**: 13783-13787.
76. Rua D., Tobe B. T., Kron S. J. (2001) Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Curr Opin Microbiol* **4**: 720-727.
77. Rupp S., Summers E., Lo H-J., Madhani H., Fink G. (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**: 1257-1269.
78. Ryan O., Shapiro R. S., Kurat C. F., Mayhew D., Baryshnikova A., Chin B., Lin Z-Y., Cox M. J., Vizeacoumar F., Cheung D., Bahr S., Tsui K., Tebbji F., Sellam A., Istel F. (2012) Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth. *Science* **337**: 1353-1356.
79. Sarode N., Miracle B., Peng X., Ryan O., Reynolds T. B. (2011) Vacuolar protein sorting genes regulate mat formation in *Saccharomyces cerevisiae* by Flo11p-dependent and – independent mechanisms. *Eukaryotic Cell* **10**: 1516-1526.
80. Schmittgen T. D., Livak K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**: 1101-1108.
81. Schröder M., Chang J. S., Kaufman R. J. (2000) The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev* **14**: 2962-2975.

82. Smukalla S., Caldara M., Pochet N., Beauvais A., Guadagnini S., Yan C., Vences M. D., Jansen A., Prevost M. C., Latge J. P., Fink G. R., Foster K. R., Verstrepen K. J. (2008) *FLO1* is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **135**: 726-737.
83. Zara S., Bakalinsky A. T., Zara G., Pirino G., Demontis M. A., Budroni M. (2005) *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Envir Biol* **71**: 2934-2939.
84. Toda T., Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* **40**: 27-36.
85. Vachova L., Stovicek V., Hlavacek O., Chernyavskiy O., Štepanek L., Kubinova L., Palkova Z. (2011) Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. *J Cell Biol* **5**: 679-687.
86. Vallejo J. A., Sanchez-Pérez A., Martinez J. P., Villa T. G. (2013) Cell aggregations in yeasts and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 2305-2318.
87. Vandenbosch D., de Canck E., Dhondt I., Rigole P., Nelis H. J., Coenye T. (2013) Genomewide screening for genes involved in biofilm formation and miconazole susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **13**: 720-730.
88. Verstrepen K. J., Jansen A., Lewitter F., Fink G. R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat Genet* **37**: 986-990.
89. Voordeckers K., De Maeyer D., van der Zande E., Vences M. D., Meert W., Cloots L., Ryan O., Marchal K., Verstrepen K. J. (2012) Identification of a complex genetic Network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol Microbiol* **86**: 225-239.
90. Vyas V. K., Kuchin S., Berkey C. D., Carlson M. (2003) Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol Cell Biol* **23**: 1341-1348.
91. Williamson D. (2002) The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat Rev Genet* **3**: 2-7.
92. Wright R. M., Repine T., Repine T. E. (1993) Reversible pseudohyphal growth in haploid *Saccharomyces cerevisiae* is an aerobic process. *Curr Genet* **23**: 388-391.

### **Kasutatud veebiaadressid**

*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org>

## Lisad

### Lisa 1. Töös kasutatud pagaripärmi $\Sigma 1278b$ tüved

Tüve nr	Tüve nimi	Genotüüp	Allikas
SC $\Sigma$ -48	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>MATa [rho</i> <sup>+</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0</i>	Aun jt, 2013
SC $\Sigma$ -139	<i><math>\Delta</math>mip1</i>	<i>MATa [rho</i> <sup>0</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX6</i>	Aun jt, 2013
SC $\Sigma$ -160	<i>rho</i> <sup>-</sup>	<i>MATa [rho</i> <sup>-</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0</i>	Aun jt, 2013
SC $\Sigma$ -320	<i><math>\Delta</math>sfl1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 sfl1<math>\Delta</math>::hphMX6</i>	Aun jt, 2013
SC $\Sigma$ -543	<i><math>\Delta</math>ram1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 ram1<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -544	<i><math>\Delta</math>msc7</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 msc7<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -547	<i><math>\Delta</math>sip4</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 sip4<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -549	<i><math>\Delta</math>ssk2</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 ssk2<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -551	<i><math>\Delta</math>shr5</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 shr5<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -607	<i><math>\Delta</math>gpa2</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 gpa2<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Kruuse, 2013
SC $\Sigma$ -619	<i><math>\Delta</math>pex18</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 pex18<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SC $\Sigma$ -621	<i><math>\Delta</math>ssa4</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 ssa4<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SC $\Sigma$ -623	<i><math>\Delta</math>mid1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mid1<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SC $\Sigma$ -625	<i><math>\Delta</math>depl1</i>	<i>MATa [rho</i> <sup>+</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 depl1<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SC $\Sigma$ -627	<i><math>\Delta</math>mip1 <math>\Delta</math>pex18</i>	<i>MATa [rho</i> <sup>0</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX6 pex18<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SC $\Sigma$ -629	<i><math>\Delta</math>mip1 <math>\Delta</math>ssa4</i>	<i>MATa [rho</i> <sup>0</sup> <i>] ura3-52 leu2<math>\Delta</math>0 mip1<math>\Delta</math>::natMX6 ssa4<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	Tiina Tamm



SCΣ-631	<i>Δmip1 Δmid1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 mid1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-633	<i>Δmip1 Δdep1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 dep1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-635	<i>rho<sup>-</sup> Δpex18</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 pex18Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-637	<i>rho<sup>-</sup> Δssa4</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 ssa4Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-639	<i>rho<sup>-</sup> Δmid1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mid1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-641	<i>rho<sup>-</sup> Δdep1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 dep1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-644	<i>Δoca1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 oca1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-646	<i>Δidp3</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 idp3Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-648	<i>Δgyp8</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 gyp8Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-650	<i>Δmkt1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 mkt1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-652	<i>Δmdm31</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 mdm31Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-654	<i>rho<sup>-</sup> Δoca1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 oca1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-656	<i>rho<sup>-</sup> Δmdm31</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mdm31Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-658	<i>rho<sup>-</sup> Δmkt1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mkt1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-660	<i>rho<sup>-</sup> Δidp3</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 idp3Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-662	<i>rho<sup>-</sup> Δgyp8</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 gyp8Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-664	<i>Δmip1 Δmkt1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 mkt1Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm

SCΣ-666	<i>Δmip1 Δmdm31</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 mdm31Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-668	<i>Δmip1 Δocal</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 ocalΔ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-670	<i>Δmip1 Δidp3</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 idp3Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-672	<i>Δmip1 Δgyp8</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 gyp8Δ::kanMX6</i>	Tiina Tamm
SCΣ-674	<i>rho<sup>-</sup> Δtre1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 tre1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-675	<i>rho<sup>-</sup> Δvps13</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 vps13Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-677	<i>rho<sup>-</sup> Δapm4</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 apm4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-679	<i>rho<sup>-</sup> Δpdx1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 pdx1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-683	<i>rho<sup>-</sup> Δydr444w</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 ydr444wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-685	<i>rho<sup>-</sup> Δnful</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 nfulΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-686	<i>rho<sup>-</sup> Δrsm28</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 rsm28Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-688	<i>Δvps13</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 vps13Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-690	<i>Δapm4</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 apm4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-692	<i>Δpdx1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 pdx1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-694	<i>Δtre1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 tre1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-696	<i>Δnful</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 nfulΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-698	<i>Δrsm28</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 rsm28Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö

SCΣ-700	<i>Δydr444w</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 ydr444wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-702	<i>Δmip1 Δtre1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 tre1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-704	<i>Δmip1 Δrsm28</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 rsm28Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-706	<i>Δmip1 Δnful</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 nfulΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-709	<i>Δmip1 Δvps13</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 vps13Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-719	<i>Δldb17</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 ldb17Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-721	<i>Δpaa1</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 paa1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-723	<i>Δypr027c</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 ypr027cΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-724	<i>Δyhr045w</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 yhr045wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-727	<i>Δmip1 Δapm4</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 apm4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-729	<i>Δmip1 Δslf1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 slf1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-739	<i>Δmip1 Δypr027c</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 ypr027cΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-732	<i>Δmip1 Δyhr045w</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 yhr045wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-734	<i>rho<sup>-</sup> Δoca2</i>	<i>MATα [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 oca2Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-736	<i>rho<sup>-</sup> Δpaa1</i>	<i>MATα [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 paa1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-738	<i>rho<sup>-</sup> Δtma22</i>	<i>MATα [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 tma22Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-740	<i>rho<sup>-</sup> Δldb17</i>	<i>MATα [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 ldb17Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö

SCΣ-742	<i>rho<sup>-</sup> Δypr027c</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 ypr027cΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-744	<i>rho<sup>-</sup> Δyhr045w</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 yhr045wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-746	<i>rho<sup>-</sup> Δoca4</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 oca4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-748	<i>rho<sup>-</sup> Δslf1</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 slf1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-750	<i>rho<sup>-</sup> Δscyl</i>	<i>MATa [rho<sup>-</sup>] ura3-52 leu2Δ0 scylΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-752	<i>Δtma22</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 tma22Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-756	<i>Δscyl</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 scylΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-757	<i>Δoca4</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 oca4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-759	<i>Δmip1 Δtma22</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 tma22Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-760	<i>Δmip1 Δpaa1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 paa1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-762	<i>Δmip1 Δpdx1</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 pdx1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-763	<i>Δmip1 Δscyl</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 scylΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-765	<i>Δmip1 Δoca4</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 oca4Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-766	<i>Δmip1 Δoca2</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 oca2Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-770	<i>Δmip1 Δldb17</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 ldb17Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-773	<i>Δmip1 Δydr444w</i>	<i>MATa [rho<sup>0</sup>] ura3-52 leu2Δ0 mip1Δ::natMX6 ydr444wΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-775	<i>Δymr158c-a</i>	<i>MATa ura3-52 leu2Δ0 ymr158c-aΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö

SCΣ-777	<i>Δpda1</i>	MATa <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>pda1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-779	<i>Δoca2</i>	MATa <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>oca2Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-780	<i>rho<sup>-</sup> Δymr158c-a</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ</i> <i>ymr158c-aΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-782	<i>rho<sup>-</sup> Δpda1</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>pda1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-784	<i>Δmip1 Δymr158c-a</i>	MATa [ <i>rho<sup>0</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>mip1Δ::natMX6 ymr158c-aΔ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-786	<i>Δmip1 Δpda1</i>	MATa [ <i>rho<sup>0</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>mip1Δ::natMX6 pda1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-796	<i>Δslf1</i>	MATa <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>slf1Δ::kanMX6</i>	Käesolev töö
SCΣ-807	<i>rho<sup>-</sup></i> <i>TEF1p3</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>P<sub>TEF1-mut3</sub>::FLO11::LEU2</i>	Käesolev töö
SCΣ-823	<i>rho<sup>-</sup></i> <i>TEF1p1</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>P<sub>TEF1-unmut1</sub>::FLO11::LEU2</i>	Käesolev töö
SCΣ-827	<i>rho<sup>-</sup></i> <i>TEF1p6</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>P<sub>TEF1-mut6</sub>::FLO11::LEU2</i>	Käesolev töö
SCΣ-834	<i>rho<sup>-</sup></i> <i>TEF1p9</i>	MATa [ <i>rho<sup>-</sup></i> ] <i>ura3-52 leu2Δ0</i> <i>P<sub>TEF1-mut9</sub>::FLO11::LEU2</i>	Käesolev töö

**Lisa 2. Töös kasutatud pagaripärmi BY4741 tüved**

<b>Tüve nr</b>	<b>Tüve nimi</b>	<b>Genotüüp</b>	<b>Allikas</b>
741	<i>Δymr158c-a</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ymr158c-aΔ::kanMX6</i>	Euroscarf
1528	<i>Δyll040c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 vps13Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
1754	<i>Δyol062c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 apm4Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
2076	<i>Δypl176c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tre1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
3844	<i>Δydl146w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ldb17Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
4328	<i>Δydr494w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rsm28Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
4450	<i>Δygl083w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 scy1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
4823	<i>Δygr193c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pdx1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
4889	<i>Δykl040c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 nfulΔ::kanMX6</i>	Euroscarf
5446	<i>Δypr027c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ypr027cΔ::kanMX6</i>	Euroscarf
6174	<i>Δyer178w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 pda1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
6413	<i>Δyhr045w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 yhr045wΔ::kanMX6</i>	Euroscarf
6691	<i>Δydr071c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 paa1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
6812	<i>Δyjr014w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tma22Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
6962	<i>Δycr095c</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 oca4Δ::kanMX6</i>	Euroscarf
7211	<i>Δynl056w</i>	<i>MATa his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf

		<i>oca2Δ::kanMX6</i>	
7259	<i>Δydr444w</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ydr444wΔ::kanMX6</i>	Euroscarf
7267	<i>Δydr515w</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>slf1Δ::kanMX6</i>	Euroscarf

### Lisa 3. Deletsiioonimutantide konstrueerimiseks kasutatud praimerite järjestused

Praimeri nimi	Järjestus (5' - 3' suunas)
<i>pYM_check_reverse</i>	GCGCACGTCAAGACTGTCAAGG
<i>pdx1_del_forward</i>	CTTGTATGTTTCGTATACTGTAGC
<i>pdx1_del_reverse</i>	AACTGTTACCCAGACACCTACGATG
<i>pdx1_check_forward</i>	CCAAGATTGTCCCCTTAAGCGAACTG
<i>nful_del_forward</i>	CCACTTAGCGGAGTCCTGGTGATTGTAG
<i>nful_del_reverse</i>	TCCATGATGACCGTTGAAACATGTACGG
<i>nful_check_forward</i>	AAGTACCACACTCTAGCCGAAAAGAGG
<i>apm4_del_forward</i>	TTTCAACTGCGGTCGAAGGGTAACAGC
<i>apm4_del_reverse</i>	CTAGAAGTACCAGTGCCTCTTGATTGC
<i>apm4_check_forward</i>	GGCAGAAGCGGACTTGCAGGCACTG
<i>pda1_del_forward</i>	CTCTCTTCTGATTCCCTCCACCCCTTC
<i>pda1_del_reverse</i>	TTCCTGATTGGCATAACAGACTACAGC
<i>pda1_check_forward</i>	CATGTGCATGTACACACGTAATCGCGC
<i>tre1_del_forward</i>	CTAGCTCGACAGTCTCGGGTTGCAAAC
<i>tre1_del_reverse</i>	AATTCCCCGCGGAGATGTCCATACTGAC
<i>tre1_check_forward</i>	TCGTACGCCGACTCGATCTTTGTAAG
<i>rsm28_del_forward</i>	GCTACTGAAACAGCGTAGTTGCTAGTGC
<i>rsm28_del_reverse</i>	ATCCATTTCTGACGAACTAAGCCGGAA
<i>rsm28_check_forward</i>	ATGAGACGATTGCAGACCCTACGG
<i>vps13_del_forward</i>	TCTCCAGTAAACGCACATAAGCCGACC
<i>vps13_del_reverse</i>	CCTTTCAATCCCTTCCTTTAGCCTAAC
<i>vps13_check_forward</i>	CCACTCTTCACCTTGTCTTGAGGTTGAGG
<i>yhr045w_del_forward</i>	TGAGAATCCTAGGACCCTTGGTTTGGTC

<i>yhr045w_del_reverse</i>	TATGACTGATCGTCAGCACATTAGGCCT
<i>yhr045w_check_forward</i>	GGTAGAAGGCGTGTGTAGAAGAGCCCAG
<i>ydr444w_del_forward</i>	CTACACTACTTGATCCGGCACTACCC
<i>ydr444w_del_reverse</i>	TCCCAGCCAGTCTAACGTTTAAGGAC
<i>ydr444w_check_forward</i>	CTATCGCAGGAGGTGTCGGTACCG
<i>ypr027c_del_forward</i>	GATGTTGGCTAGCAGATCGAGATTCTG
<i>ypr027c_del_reverse</i>	AGATACGCCAGAGTAAACGCATTCCTAC
<i>ypr027c_check_forward</i>	TCAGCGACTAACTTCGGCGGCTATATG
<i>tma22_del_forward</i>	CTGACGTGAACCTTGCACCATGTACATC
<i>tma22_del_reverse</i>	GGTTTCAGAGAAGGAACGGCGCAGGC
<i>tma22_check_forward</i>	CGTCACCAATGTGTGGCTACTGGGTC
<i>ldb17_del_forward</i>	GCCACGTATTGCTCTCATTCTCTTCAC
<i>ldb17_del_reverse</i>	TCTGCCAGCATGTATTTCGGAAGCAACC
<i>ldb17_check_forward</i>	GAATTGCTGGACCTAACGGAGAGCC
<i>oca4_del_forward</i>	CTACTTATGGCTGTCCTTACCGTATGC
<i>oca4_del_reverse</i>	GACAAAGAACTCCCAGGGTTTGCTATTC
<i>oca4_check_forward</i>	GAACTGTCATCCAGAAGCCCAATGCTC
<i>scy1_del_forward</i>	CTTGACATATTAAAGCGCACAAAAGTATTC
<i>scy1_del_reverse</i>	GATTCCCCTGATCCCGCACCGTCCAG
<i>scy1_check_forward</i>	CCCTTTCAGTGTCTTTTTTGGCACAC
<i>slf1_del_forward</i>	TTGGCACATCCTTGGTTGACACTTGTC
<i>slf1_del_reverse</i>	CGCAGCTTTGTGTGCTCTGGTGGCA
<i>slf1_check_forward</i>	GGACTGCTTTGGAGTTGAATCTATGC
<i>oca2_del_forward</i>	TGAGAAGGGAGGCTGTCACCAGGTTC
<i>oca2_del_reverse</i>	GTTGGTCTTTGTCTTCGACGCTTGAAC
<i>oca2_check_forward</i>	GGAAGGTCTCTTCTGACCAGCGATAC
<i>paa1_del_forward</i>	CGACGAACATCCCACTGGACAAGAAG
<i>paa1_del_reverse</i>	GATATCTCAGTACGGTCAAGGATGTAGG
<i>paa1_check_forward</i>	AAGGTTAGGCGACAAAGTGGATACAAG
<i>ymr158c-a_del_forward</i>	CATTATACGTGAGTCGAAGGATGGCC
<i>ymr158c-a_del_reverse</i>	AGACGAAGATCCTACGCCAAATCTTAGC
<i>ymr158c-a_check_forward</i>	ATGCATGCGGCCTGTTTATTCTGGTT



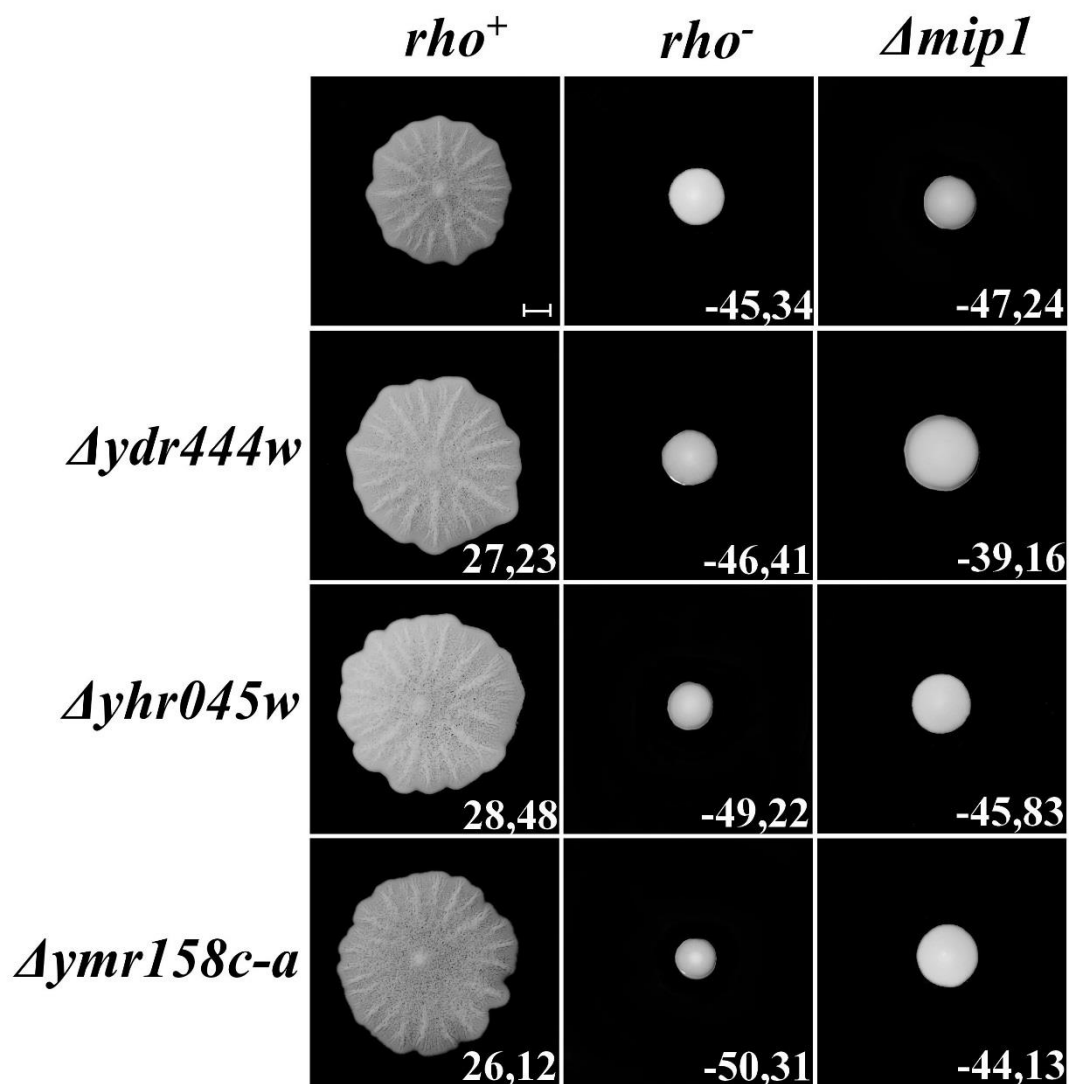
**Lisa 4. Erineva *FLO11* ekspressioonitasemega tüvede konstrueerimiseks kasutatud praimerite järjestused**

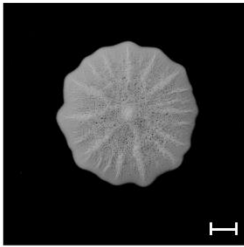
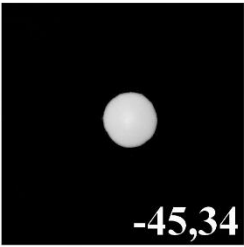

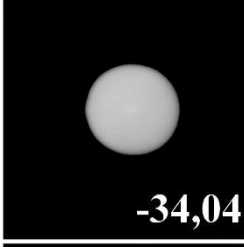
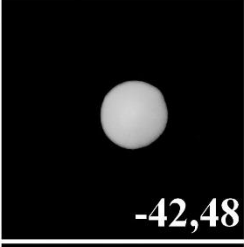
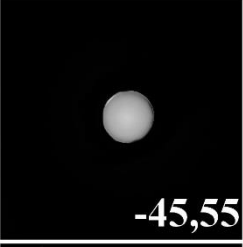
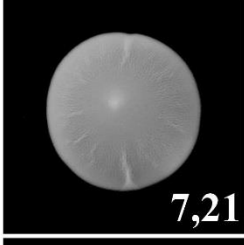
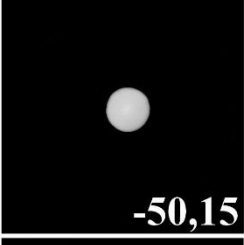
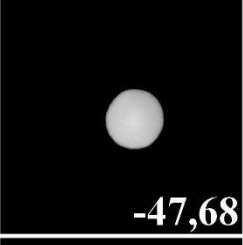
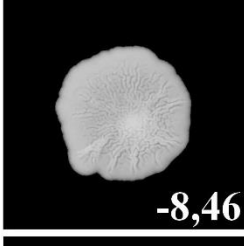
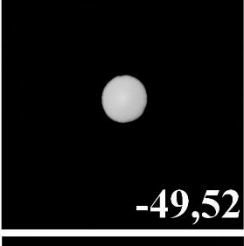
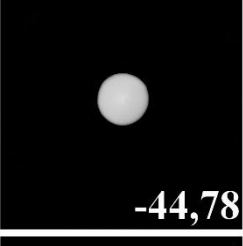
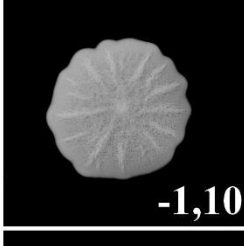

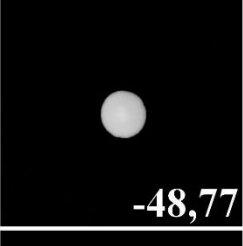
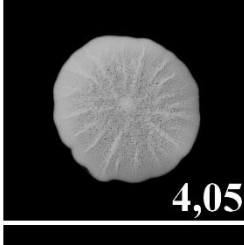
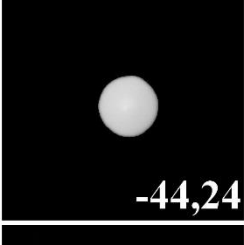
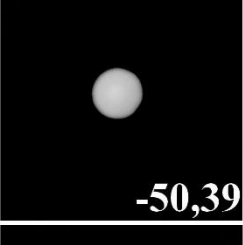
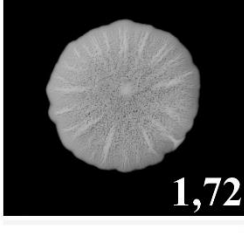
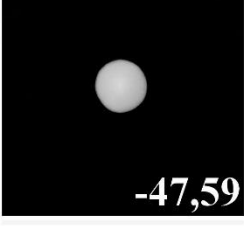
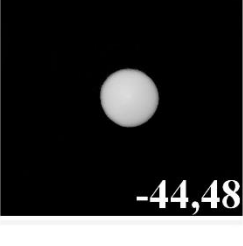
<b>Praimeri nimi</b>	<b>Järjestus (5'-3' suunas)</b>
<i>FLO11_up_forward</i>	CCAATTGGGATTCAAGGCATCATCGC
<i>FLO11_down_reverse</i>	GTGGCTGTGAAATCAGTTGGGTTGTC
<i>FLO11_forward</i>	AAAGCACCCCTATTCATCAGTTATTATCCCTCGTCAT GTTGTGGTTCTAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC
<i>LEU2_contl_reverse</i>	GCTTCCCTACCTGACACTAACAAGG

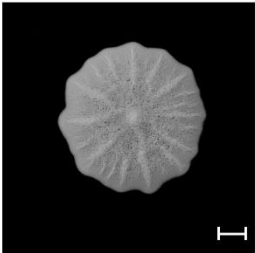
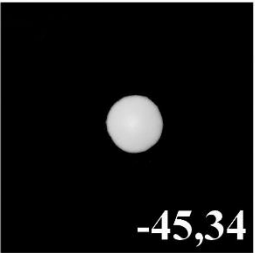
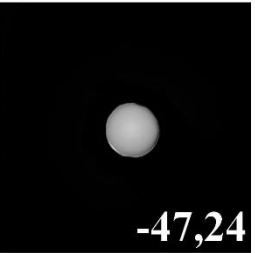
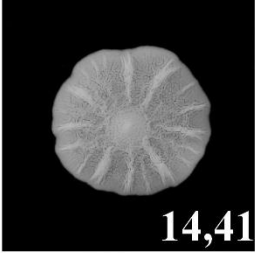
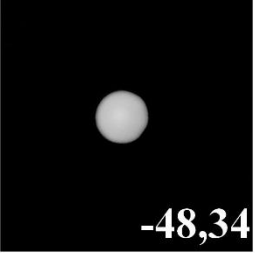
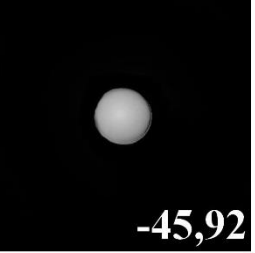
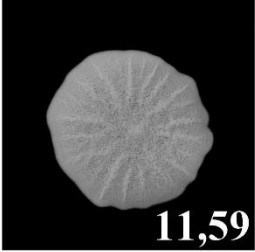
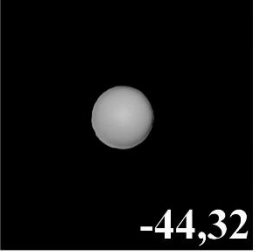
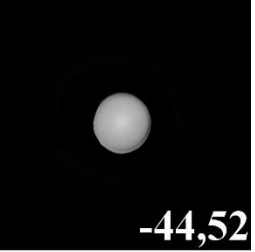
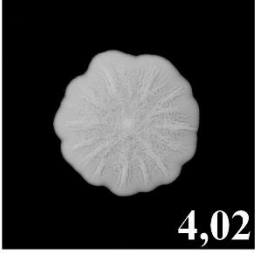
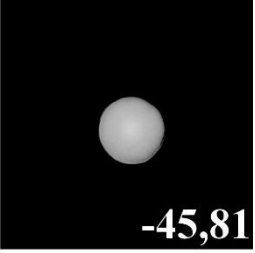
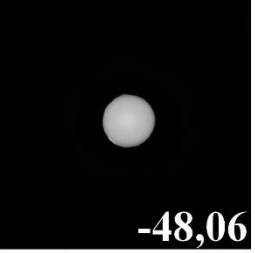
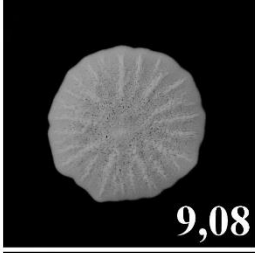
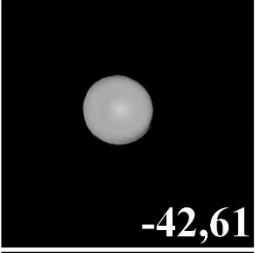
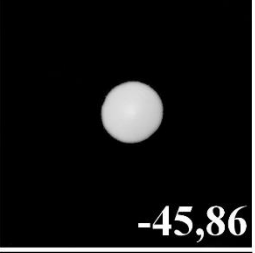
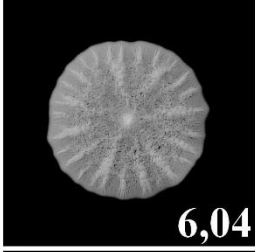

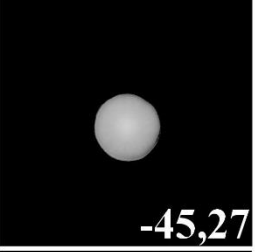
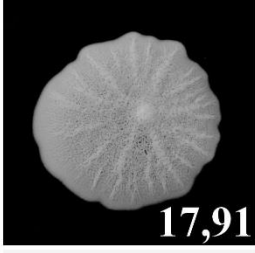
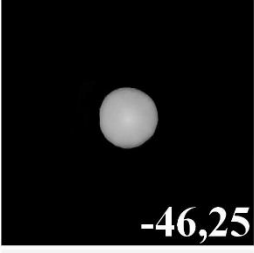

**Lisa 5. qRT-PCR reaktsiooniks kasutatud praimerite järjestused**

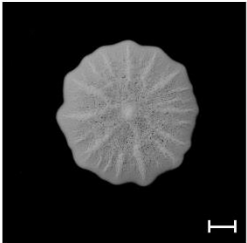
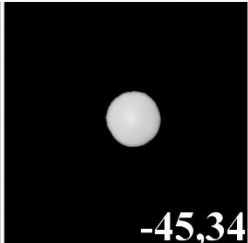

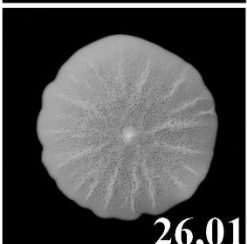
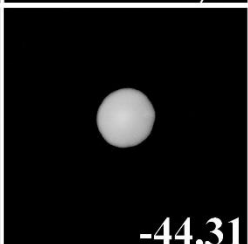
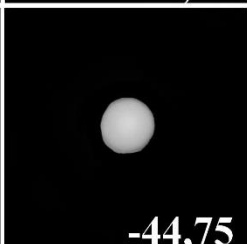
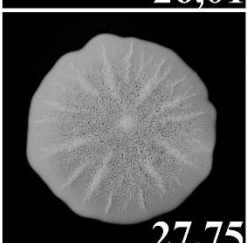
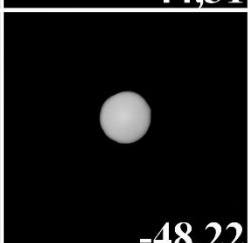
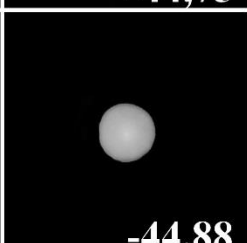
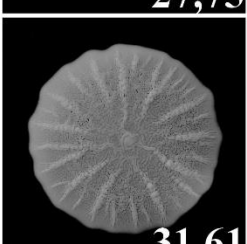
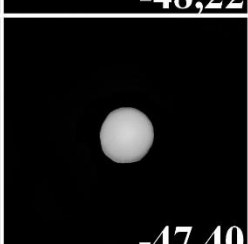
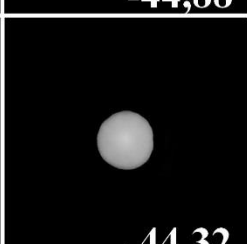
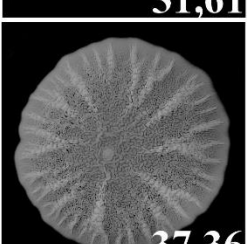
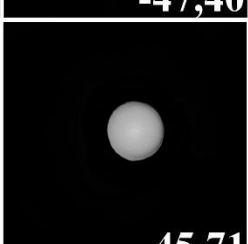
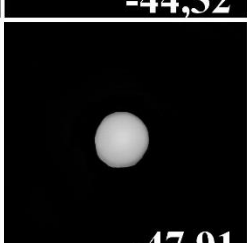
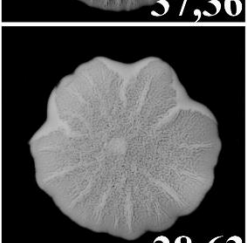
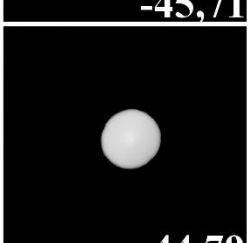
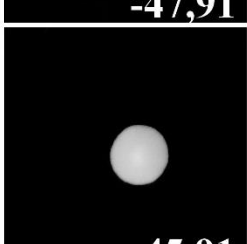
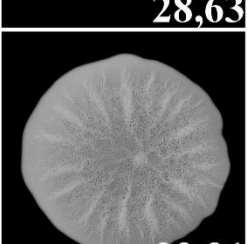
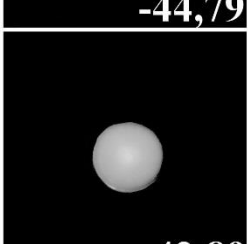
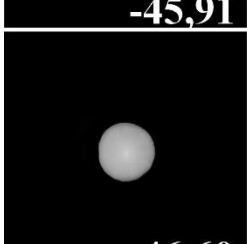
<b>Praimeri nimi</b>	<b>Järjestus (5'-3' suunas)</b>
<i>RT_FLO11_forward</i>	TATACTGCATGATATTTTGCTGGTCC
<i>RT_FLO11_reverse</i>	TATTTGGTCCTTTTCGCTTCTATTAAAC
<i>RT_ARP6_forward</i>	ACTACAAAGGCAATTACCCACAGATTG
<i>RT_ARP6_reverse</i>	CGGGACCATGCTCATAGTATTCTTC
<i>RT_UBC6_forward</i>	CAGGAAAATGTAGAGACATTAGAAAAGAG
<i>RT_UBC6_reverse</i>	GCTTGTTTCAGCGCGTATTCTGTC

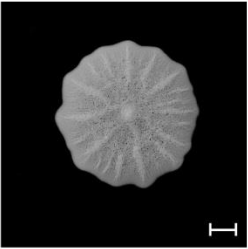

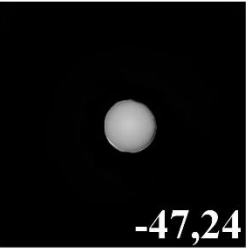
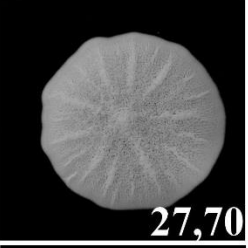
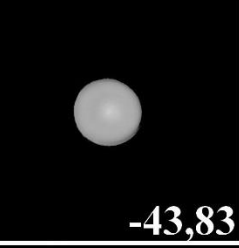
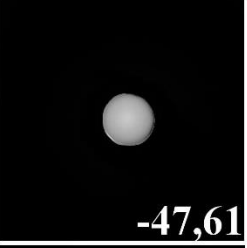
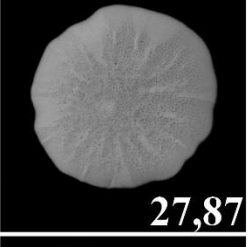

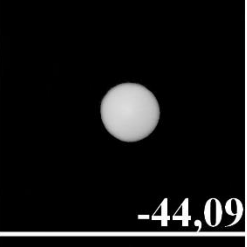
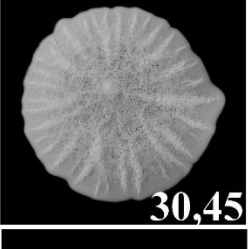
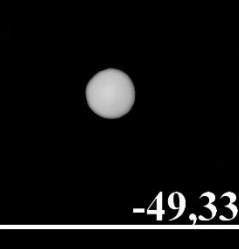
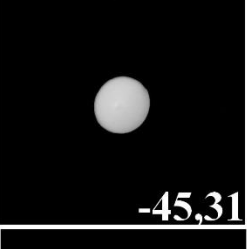
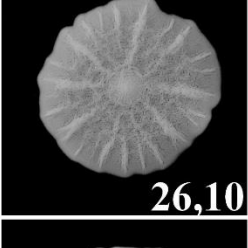
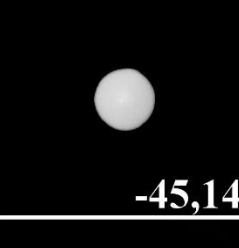
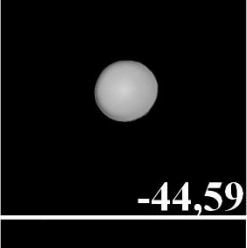
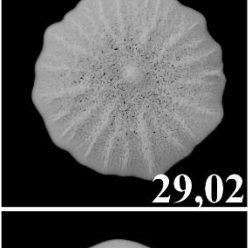

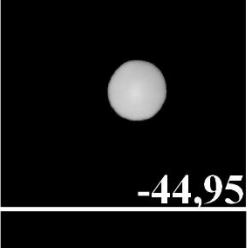
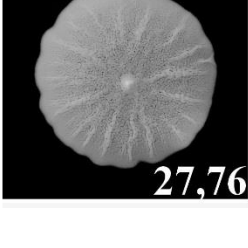
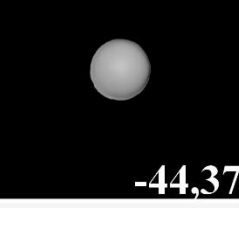
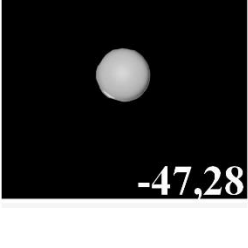
**Lisa 6. Geneetiliste interaktsioonide analüüs  $\rho^+$  deletsioonimutantide ja  $\rho$ -mutantide vahel.** Joonistel on kujutatud viis päeva 25 °C juures pooltahkel YPD söötmel kasvanud kolooniad, millel on arvutatud matja koloonia moodustumise skoor metsiktüüpi  $\rho^+$  tüve suhtes. Iga tüve puhul on näidatud vähemalt kümne paralleeli keskmistatud skoor. Mõõtjoon – 10 mm.



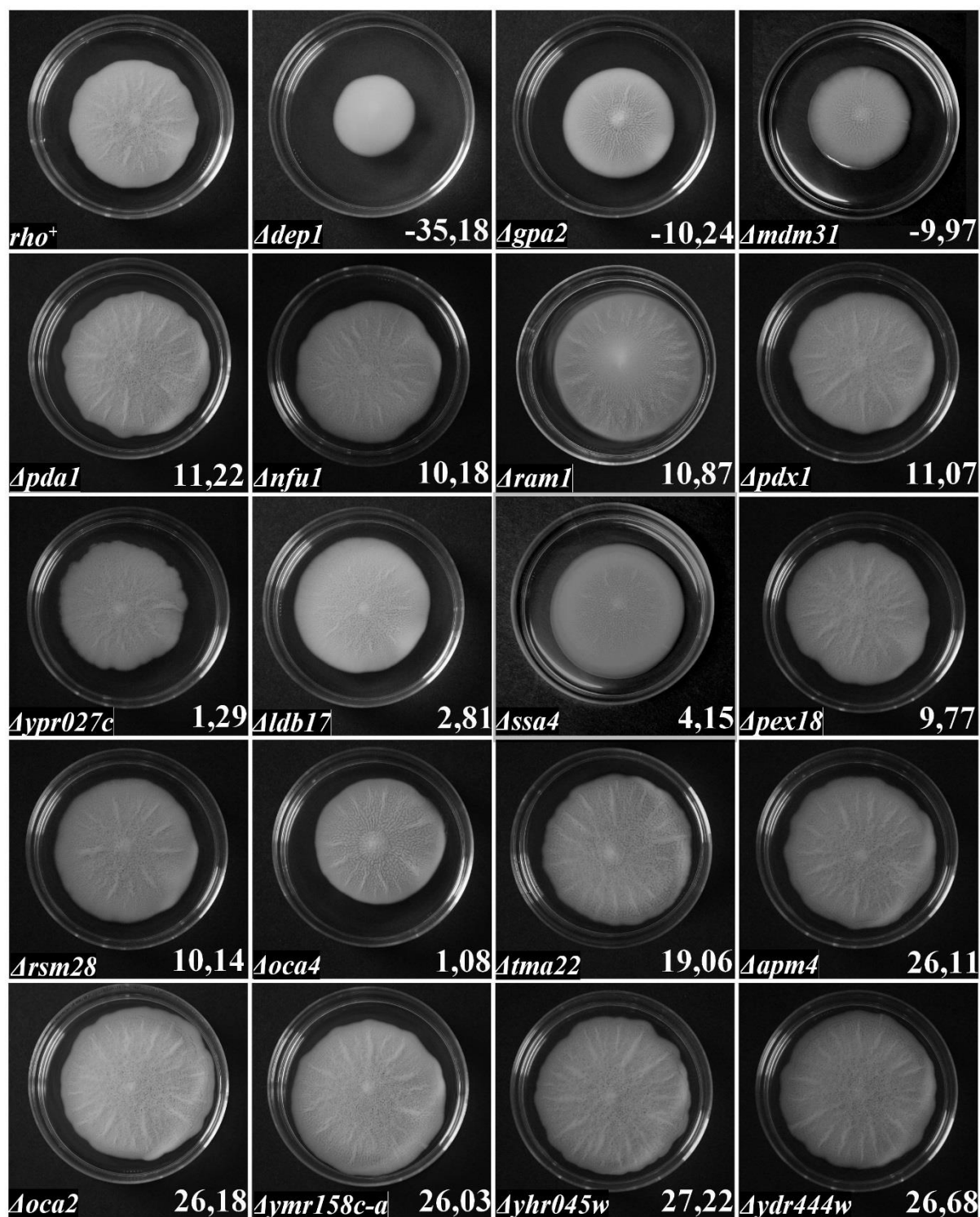
	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>rho</i> <sup>-</sup>	<i>Δmip1</i>
	 1	 -45,34	 -47,24
<i>Δdep1</i>	 -34,04	 -42,48	 -45,55
<i>Δldb17</i>	 7,21	 -50,15	 -47,68
<i>Δmdm31</i>	 -8,46	 -49,52	 -44,78
<i>Δpda1</i>	 -1,10	 -50,99	 -48,77
<i>Δpdx1</i>	 4,05	 -44,24	 -50,39
<i>Δnfu1</i>	 1,72	 -47,59	 -44,48

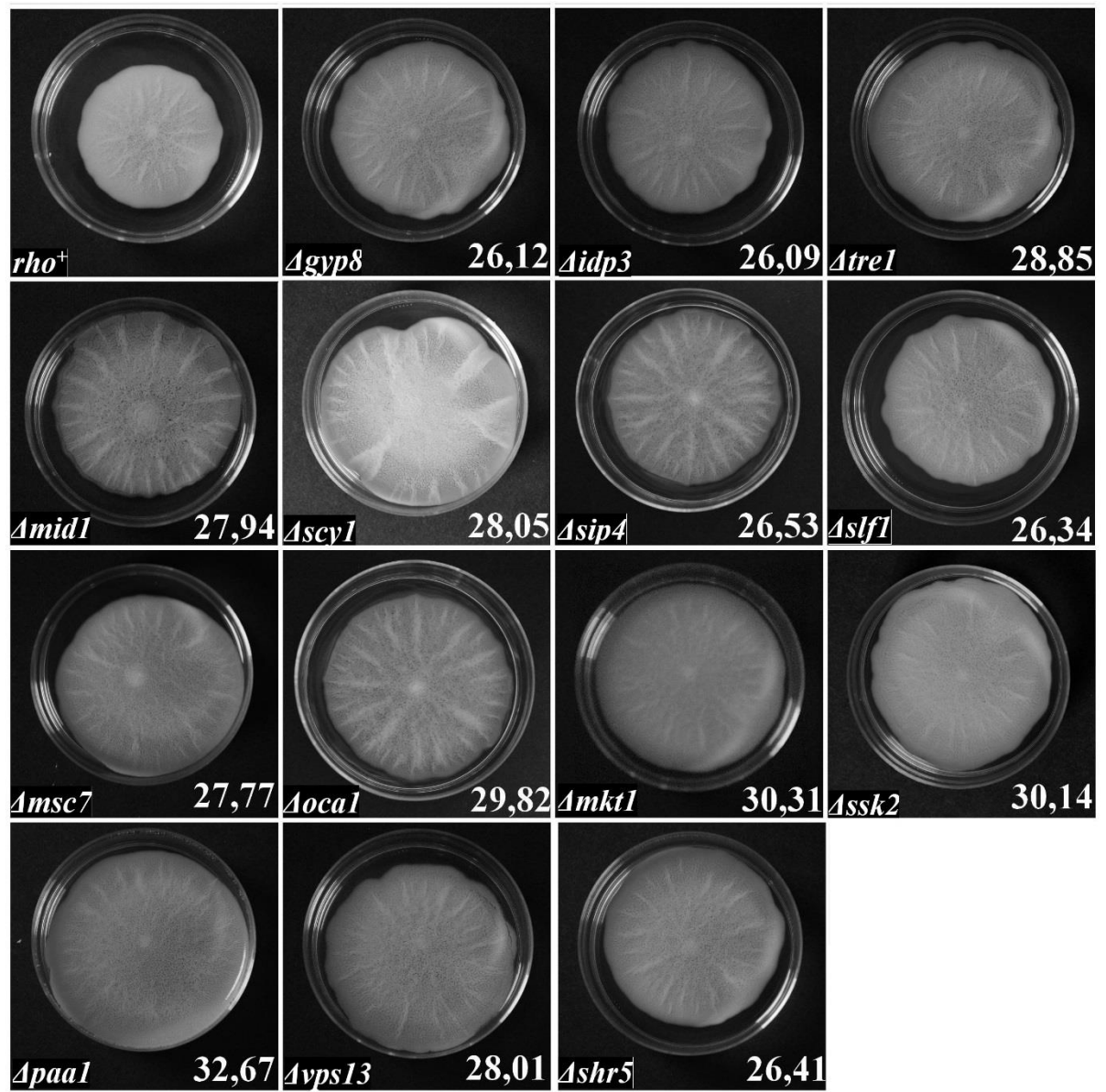
	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>rho</i> <sup>-</sup>	<i>Δmip1</i>
	 14,41	 -45,34	 -47,24
<i>Δoca4</i>	 14,41	 -48,34	 -45,92
<i>Δpex18</i>	 11,59	 -44,32	 -44,52
<i>Δrsm28</i>	 4,02	 -45,81	 -48,06
<i>Δssa4</i>	 9,08	 -42,61	 -45,86
<i>Δypr027c</i>	 6,04	 -48,84	 -45,27
<i>Δtma22</i>	 17,91	 -46,25	 -49,25

	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>rho</i> <sup>-</sup>	<i>Δmip1</i>
	 26,01	 -45,34	 -47,24
<i>Δapm4</i>	 26,01	 -44,31	 -44,75
<i>Δidp3</i>	 27,75	 -48,22	 -44,88
<i>Δmkt1</i>	 31,61	 -47,40	 -44,32
<i>Δpaa1</i>	 37,36	 -45,71	 -47,91
<i>Δscy1</i>	 28,63	 -44,79	 -45,91
<i>Δvps13</i>	 33,21	 -42,89	 -46,60

	<i>rho</i> <sup>+</sup>	<i>rho</i> <sup>-</sup>	<i>Δmip1</i>
	 27,70	 -45,34	 -47,24
<i>Δgyp8</i>	 27,70	 -43,83	 -47,61
<i>Δmid1</i>	 27,87	 -44,22	 -44,09
<i>Δoca1</i>	 30,45	 -49,33	 -45,31
<i>Δoca2</i>	 26,10	 -45,14	 -44,59
<i>Δslf1</i>	 29,02	 -45,65	 -44,95
<i>Δtre1</i>	 27,76	 -44,37	 -47,28

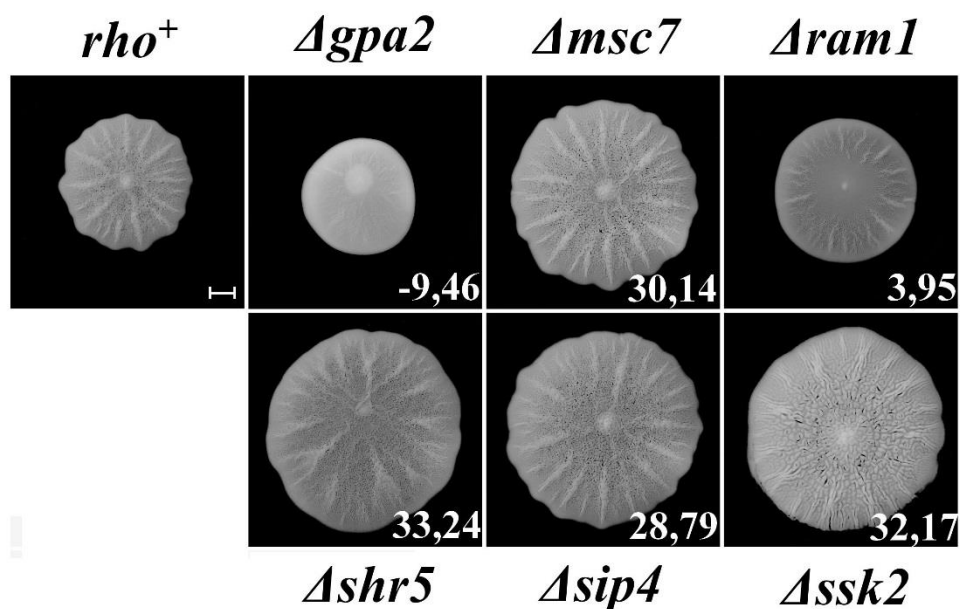
**Lisa 7. 5 cm läbimõõduga Petri tassidel kasvanud matjad kolooniad.** Joonisel on kujutatud viis päeva 25 °C juures pooltahkel YPD söötmel kasvanud matjad kolooniad. Näidatud on metsiktüüpi  $\rho^+$  ja selle baasil konstrueeritud deletsioonimutantide matid. Matja koloonia moodustumise skoorid on arvutatud metsiktüüpi  $\rho^+$  tüve suhtes. Iga tüve puhul näidatud skoor on vähemalt viie paralleeli keskmistatud tulemus.







**Lisa 8.** Varem analüüsitud hüpermatte moodustavate deletsioonimutantide matjad kolooniad. Joonisel on toodud viis päeva 25 °C juures poolvedelal YPD söötmel kasvanud matjad kolooniad, millel on arvatatud matja koloonia moodustamise skoorid. Skoorid on arvatatud metsiktüüpi  $\rho^+$  tüve suhtes. Joonisel on toodud vähemalt kümne paralleeli keskmistatud tulemused. Mõõtjoon – 10 mm.



## **Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Geidi Mitt,

(sünnikuupäev: 05.09.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud teose

### ***FLO11* ekspressioon *Saccharomyces cerevisiae* libisevalt kasvavates rakkudes**

mille juhendaja on vanemteadur Tiina Tamm,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015